Beeinflussung adrenerger Rezeptoren im Gehirn der Ratte durch trizyklische Antidepressiva und thyreogene Hormone

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Christoph Kopanski
aus Löwen

1983

GEN.
LIBRARY
UCL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0100

Beeinflußung adrenerger Rezeptoren im Gehirn der Ratte durch trizyklische Antidepressiva und thyreogene Hormone

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Christoph Kopanski
aus Löwen

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	8. November 1983
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. J.E. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. J. E. Schultz danke ich für die Überlassung des Themas; besonders für seine intensive und hilfreiche Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.1.	Abkürzungen	1
1.2.	Nomenklatur der getesteten Antidepressiva	1
2.	Einleitung	3
3.	Material und Methoden	7
3.1.1.	Chemikalien	7
3.1.2.	Radiochemikalien	7
3.1.3.	Lösungen	7
3.2.	Geräte	8
3.3.	Tiere	8
3.4.	Beobachtung der Tiere während der Vorbehandlung	9
3.5.1.	Vorbehandlung der Tiere mit den Antidepressiva, bzw. mit T4 oder TRH	9
3.5.2.	Vorbehandlung der Tiere mit Oxaprotilin für ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmestudien am Herzen der Ratte	10
3.6.	Präparation der Gehirnteile	10
3.7.	Inkubation der Gehirnschnitte	11
3.8.	Säulenchromatographische Reinigung des cAMP	12
3.9.	Bestimmung der Ausbeute	12
3.10.	Quantitative Bestimmung von cAMP	13
3.10.1.	Prinzip	13
3.10.2.	Durchführung des Gilman-Tests	13
3.11.	Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry	15
3.12.	Bestimmung der Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin in Gehirnrindenschnitten der Ratte	15
3.12.1.	Prinzip	15
3.12.2.	Inkubation der Hirnrindenschnitte	16
3.13.	Dihydroalprenololbindungstest	17
3.13.1.	Präparation der Gehirnteile	17
3.13.2.	Durchführung des Tests	17
3.14.	Auswertung der Ergebnisse	18

		Seite
4.	Ergebnisse	19
4.1.1.	Motorische Aktivität der Tiere während der Vorbehandlung	19
4.1.2.	Gewichtszunahme der Tiere während der Vorbehandlung	20
4.2.	Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit nach Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva unterschiedlicher chemischer Struktur	22
4.2.1.	Variationen der Seitenkette und Substitution eines Aromaten	24
4.2.2.	Variationen des zentralen Ringes im trizyklischen Grundgerüst	27
4.2.2.1.	Zusätzliche ungesättigte Bindung im zentralen Ring	27
4.2.2.2.	Einfügen von Heteroatomen in den zentralen Azepinring	28
4.2.2.3.	Einfügen von Heteroatomen in den zentralen Zykloheptadienring	29
4.2.2.4.	Verengung des zentralen Siebenringes zum Sechsring	30
4.3.	Zeitliche Abhängigkeit für die Entwicklung der verminderten cAMP-Bildung nach Stimulation durch Noradrenalin	32
4.3.1.	Vorbehandlung von Ratten mit Antidepressiva 1 Stunde vor Versuchsbeginn	32
4.3.2.	Vorbehandlung von Ratten mit Antiedepressiva 24 Stunden vor Versuchsbeginn	34
4.4.	Stereospezifität der Antidepressiva-Wirkung	35
4.5.	Tierstamm-spezifische Abhängigkeit der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit	36
4.6.1.	Aktivität der Antidepressiva auf die präsynaptische Rückaufnahme von Noradrenalin - in vitro Versuche	38
4.6.2.	Stereospezifität der Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch Oxaprotilin und Mianserin	40
4.6.3.	Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch Oxaprotilin bei in vivo Versuchen am Rattenherz	42
4.7.	Einfluß eines Phosphodiesterasehemmers auf die Untersuchungen einer veränderten cAMP-Bildung	43

		Seite
4.8.	Einfluß von T4 und TRH auf das adrenerge System im Gehirn der Ratte	44
4.8.1.	In vitro-Zugabe von T4 und TRH	44
4.8.2.	Einfluß einer 9 tägigen Behandlung mit T4 und TRH auf das cAMP-bildende System	45
4.8.3.	T4-Konzentrations-Abhängigkeit für die Entwicklung verminderter cAMP-Bildung	45
4.8.4.	Zeitliche Entwicklung signifikant verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit mit T4	47
4.8.5.	Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch T4 und TRH bei in vitro Versuchen an Gehirnrindenschnitten der Ratte	48
4.8.6.	Einfluß einer T4-, TRH- und Imipramin-Behandlung auf die beta-Rezeptoren in der Cortex	49
4.9.	Auswirkungen einer kombinierten Behandlung mit Antidepressiva und thyreogenen Hormonen auf die Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit	53
5.	Diskussion	55
5.1.	Verhalten der Tiere während der Vorbehandlung	55
5.2.	Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit	56
5.3.	Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin	60
5.4.	Stereospezifität	61
5.5.	Einfluß des Tierstammes auf die experimentellen Ergebnisse	62
5.6.	Einfluß auf die adrenergen beta-Rezeptoren	62
5.7.	Kombinierte Behandlung mit Imipramin und T4, bzw. TRH	63
5.8.	Die Rolle des adrenergen Systems	64
6.	Zusammenfassung	65
7.	Literatur	67

1.1. Abkürzungen

AD	Antidepressivum
$B_{max.}$	maximale Anzahl der Bindungsstellen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute
DHA	Dihydroalprenolol
ECT	Elektro-konvulsive Schock Therapie
EGTA	3,6 Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
IBMX	1-Methyl-3-isobutylxanthin
IC_{50}	Konzentration bei 50% Hemmung
IMI	Imipramin
K_D	Dissoziationskonstante
LSC	Flüssigkeitsszintillationszählung (-zähler)
n	Anzahl der Tiere
NA	Noradrenalin
n.s.	nicht signifikant
S.E.M.	mittlerer Fehler des Mittelwertes
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TCA	Trichloressigsäure
TRH	Thyroliberin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon

1.2. Nomenklatur der getesteten Antidepressiva

Amitriptylin	N,N-Dimethyl-3(10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclo-hepten-5-yliden)propylamin (Roche, Basel)
Amoxapin	2-Chlor-11-(1-piperazyl)-dibenz(b,f)(1,4)oxazepin (Cyanamid, Wolfratshausen)
Butriptylin	N,N-Dimethyl-(3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclo-hepten-5-yl)-2methylpropyl)amin (-HCl; Thissen, Brüssel)
Clomipramin	3-Chlor-5-(3-dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenz (b,f)azepin (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)
Desipramin	10,11-Dihydro-5-(3-Methylaminopropyl)-5H-dibenz(b,f) azepin (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)

Dibenzepin	10-(2-(Dimethylamino)ethyl)-10,11-dihydro-5-methyl-5H-debenzo(b,e)(1,4)diazepin-11-on (-HCL; Wander, Nürnberg)
Dimetacrin	9,9-Dimethyl-10-(3-dimethylaminopropyl)-9,10-dihydro-acridin (Siegfried, Bad Säckingen)
Dosulepin	3-(6,11-Dihydrodibenzo(b,e)thiepin-11-yliden)-N,N-dimethylpropylamin (-HCl; The Boots Co., Nottingham)
Doxepin	3-(6,11-Dihydrodibenzo(b,e)oxepin-11-yliden)-N,N-dimethylpropylamin (Galenus, Mannheim)
Imipramin	5-(3-Dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenz (b,f)azepin (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)
Lofepramin	4'-Chlor-2-((3-(10,11-dihydro-5H-dibenz(b,f)azepin-5-yl) propyl)-methylamino)acetophenon (-HCl; Merck, Darmstadt)
Maprotilin	N-(3-(Dibenzo(b,e)bicyclo(2,2,2)octa-2,5-dien-1-yl) propyl)-N-methylamin (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)
Melitracen	N,N-Dimethyl-3-(10,10-dimethyl-9,10-dihydro-anthracen-9-yliden)-propylamin (HCl; Byk-Gulden, Konstanz)
Mianserin	1,2,3,4,10,14b-hexahydro-2-methyldibenzo(c,f)pyrazino (1,2-a)azepin ((+),(-)-maleat; Organon Oss)
Nortriptylin	N-Methyl-3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclo-hepten-5-yliden)-propylamin (-HCl; Tropon, Köln)
Noxiptylin	5-(2-Dimethylaminoethoxyimino)-5H-dibenzo(a,d) cyclohepten (-HCl; Dolorgiet, Bonn)
Opipramol	4-(3-(5H-Dibenz(b,f)azepin-5-yl)propyl)-1-piperazinethanol (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)
Oxaprotilin	N-(3-(Dibenzo(b,e)bicyclo(2,2,2)octa-2,5-dien-1-yl)-2-hydroxy-propyl)-N-methylamin (-HCl; Ciba-Geigy, Basel)
Propizepin	6-(2-Dimethylaminopropyl)-6,11-dihydro-5H-pyrido (2,3-b)(1,5)benzodiazepin-5-on (-HCl; UPSA, Rueill-Malmaison)
Protriptylin	N-Methyl-(3-(5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5-yl)-propyl) amin (-HCl; Merck, Sharp & Dohme, München)
Trimipramin	5-(3-Dimethylamino-2-methylpropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenz(b,f)azepin (-maleat; Rhone-Poulenc, Norderstedt)

2. Einleitung

Die Suche nach neuen Substanzen mit antihistaminerger Wirkung führte in den vierziger und fünfziger Jahren bei einer Reihe basisch substituierter Phenothiazinderivate zur Entdeckung deren antipsychotischer Wirkungskomponente. Auf Grund dieser Beobachtungen zog die Geigy AG den 1899 erstmals von Thiele und Holzinger (75) synthetisierten Grundkörper Iminodibenzyl zu Molekülvariationen für die Entwicklung von Neuroleptika heran.
1957 beschrieb R. Kuhn als erster die antidepressive Wirkung des Iminodibenzyls Imipramin (39), und zwei Jahre später veröffentlichten Domenjoz und Theobald Arbeiten über den Antagonismus von Imipramin zu Reserpin (18). 1961 zeigten Axelrod et al. die Potenzierung der Katecholamine durch Imipramin. Imipramin hemmt die Rückaufnahme von NA aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Nervenendigung (1). Dies kommt einer Reizverstärkung gleich, da dadurch die Konzentration von NA im synaptischen Spalt erhöht wird, d.h. die Kontaktzeit mit den postsynaptischen Rezeptoren wird verlängert.

Klinische Untersuchungen von Schildkraut et al. ließen auf einen Zusammenhang zwischen dem Katecholamin-Haushalt und depressiven Erscheinungen schließen. Eine Besserung der depressiven Symptome während einer Imipramin-Behandlung wurde von einer erhöhten Ausscheidung von Normetanephrin im Urin der Patienten begleitet (61). Basierend auf Axelrods und eigenen Befunden veröffentlichte Schildkraut 1965 seine grundlegende Arbeit "The catecholamine hypothesis of affective disorders" (60), die einen Zusammenhang zwischen Depression und NA-Defizit postuliert. Diese Arbeit ist heute noch Grundlage vieler Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von AD, auch wenn sich die Akzente inzwischen verlagert und erweitert haben.

Im ZNS vermitteln spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche die Wirkung von Neurotransmittern ins Zellinnere. Die Rezeptoren können an eine Adenylatzyklase gekoppelt sein und auf diese Weise die intrazelluläre Konzentration von cAMP (second messenger) beeinflußen (14,27). Vetulani et al. (77) und Schultz (65) konnten zeigen, daß nach längerer Behandlung von Ratten mit Imipramin bzw. Desipramin eine verringerte Empfindlichkeit des cAMP-bildenden Systems gegenüber NA auftritt.

Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als die Entwicklung der adrenergen Subsensitivität mit dem klinischen Wirkungseintritt weitgehend korreliert. Ähnliche Ergebnisse wurden inzwischen von anderen Autoren für weitere AD gefunden (siehe Übersichtsarbeiten 11,52,70).

Ein Fortschritt in der Psychopharmakaforschung ergab sich dadurch, daß die Rezeptorendichte auf der Zelloberfläche sowie ihre Affinität zum jeweiligen Liganden durch Bindungsmessungen bestimmbar wurden. Mit diesen Methoden war es möglich, Veränderungen an den Neurotransmitter-Rezeptoren, die eventuell infolge einer Psychopharmakatherapie entstehen, quantitativ zu erfassen. Damit wurde gezeigt, daß die Rezeptorzahl sich gegenüber Eingriffen in das neuronale Übertragungssystem variabel verhält; sei es, daß sich die postsynaptische Membran durch Neusynthese von Rezeptoren einem durch Denervation bedingten Neurotransmittermangel (Reserpin, 6-Hydroxy-Dopamin) anpaßt, oder, wie von vielen Autoren gezeigt werden konnte, die o.g. verminderte Empfindlichkeit des cAMP-bildenden Systems mit einer Verringerung der Anzahl der postsynaptischen beta-Rezeptoren einhergeht (siehe Übersichtsarbeiten 11,52,70).

Ein zusätzlicher Aspekt in der Erforschung des antidepressiven Wirkungsmechanismus fand sich durch die Ergebnisse bei der Behandlung depressiver Patienten mit Elektro-konvulsiver Schock Therapie (ECT). Biochemische Untersuchungen an Ratten zeigten, daß die Wirkung einer mehrtägigen ECT-Behandlung mit der AD-Behandlung, hinsichtlich des adrenergen Systems gut korreliert, d.h. a) erhöhter Umsatz von NA, b) verringerte Empfindlichkeit der NA abhängigen Adenylatzyklase und c) Reduktion der synaptischen beta-Rezeptoren. Auch korreliert die Veränderung an den Rezeptoren mit dem zeitlichen Verlauf des klinischen Therapieerfolges (4,26,54).

Die Ergebnisse der letzten Jahre deuten die Komplexität der Wirkungen einer antidepressiven Therapie an und lassen eine Überprüfung der Hypothese von Schildkraut (60) notwendig erscheinen.
Gegen einen direkten Zusammenhang zwischen der antidepressiven Wirkung und der Rückaufnahmehemmung von Neurotransmittern in das präsynaptische Neuron spricht, daß die o.g. Rückaufnahmehemmung bereits ca.1/2-1 Std. nach Gabe des Arzneistoffes auftritt, der Eintritt der klinischen Wirkung jedoch meist erst nach 1-2 Wochen (53,71,72).

Auch die z.T. sehr verschiedenen klinischen Krankheitsbilder einer Depression und die möglicherweise dadurch hervorgerufenen unterschiedlichen Therapieerfolge, sowie die verschiedenen Wirkungsprofile der einzelnen AD (44) lassen einen komplexeren Wirkungsmechanismus vermuten, als ihn die Rückaufnahmehemmung von Neurotransmittern darstellt. Dagegen sprechen auch Ergebnisse mit Substanzen denen eine antidepressive Wirksamkeit zugesprochen wird, jedoch keinen Einfluß auf die Rückaufnahmehemmung der Transmitter in physiologischen Konzentrationen besitzen (siehe 4.3.); oder mit Substanzen die zwar die Rückaufnahme der Transmitter hemmen, aber keine antidepressive Wirkung zeigen (72).

1978 postulierte Sulser daher eine revidierte und erweiterte Hypothese über den Wirkungsmechanismus von AD, die einen Zusammenhang zwischen der antidepressiven Wirkung und der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit herstellt (71,72). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es vermittels einer Struktur-Wirkungs-Untersuchung trizyklischer AD, eine Aussage über die Allgemeingültigkeit dieser Hypothese von Sulser zu erhalten.

Parallel zur Forschungsrichtung der Wirkung von AD auf die synaptischen Übertragungsmechanismen richtete sich das Interesse auch auf neuroendokrinologische Faktoren, die mit der Depression in Zusammenhang stehen können. Untersuchungen depressiver Patienten zeigten Änderungen im hormonellen Haushalt (ACTH, Oestrogen, Prolactin) dieser Patienten während der depressiven Phase; eine direkte Korrelation zwischen der Depression und den Schwankungen im hormonellen Haushalt konnte bis heute jedoch nicht erkannt werden (11,23,29,56).

Ein wesentlicher Punkt der neuroendokrinologischen Betrachtungen ist die Schilddrüse. Bereits 1969 veröffentlichte Whybrow et al. eine Arbeit über Beobachtungen von depressiven Symptomen an Patienten mit eingeschränkter Schilddrüsenfunktion während der letzten 100 Jahre (81). Weitere Untersuchungen bei Patienten mit endogener Depression zeigten während den akuten Depressionsphasen eine verringerte TSH-Sekretion auf TRH-Gabe (34). Die TRH Konzentration im Liquor dieser Patienten war zwar erhöht, sank jedoch auch nach einer antidepressiven Behandlung nicht ab, sodaß keine Korrelation zwischen der TRH Konzentration und der TSH-Antwort bestehen muß (35).

Die verminderte TSH-Sekretion beruht wahrscheinlich auf einer Sensitivitätsverringerung für TRH, hervorgerufen durch die erhöhte TRH Konzentration im Liquor (35). Auch Veränderungen adrenerger Rezeptoren oder Konzentrationsänderungen der T3/T4-Serumspiegel waren ohne Einfluß auf die TSH-Antwort (33). Von besonderem Interesse sind Beobachtungen verschiedener Autoren, daß eine kombinierte T3/Imipramin Behandlung den Therapieerfolg bei Patientinnen mit endogener Depression beschleunigt (21).

Die Ergebnisse dieser Arbeiten führten zu der heute allgemein vertretenen Annahme, daß die Funktion der Schilddrüse einen Faktor bei der Depression darstellen kann. Im Zusammenhang mit dem o.a. Ziel dieser Arbeit, eine Aussage über die Allgemeingültigkeit der Hypothese von Sulser zu erhalten, die eine Verbindung zwischen der antidepressiven Wirkung und dem adrenergen System sieht, ergab es sich, auch die Wirkung von T4 und TRH, unter den o.g. Gesichtspunkten auf das adrenerge System zu untersuchen und mögliche Korrelationen dieser Wirkungen von AD und thyreogenen Hormonen zu prüfen.

3. Material und Methoden

3.1.1. Chemikalien

Behringwerke, Marburg	Rinderserumalbumin
Boehringer, Mannheim	cAMP
Calbiochem	TRH
Riedel-de Haen, Seelze	Ethylenglykolmonomethylether
Serva, Heidelberg	Dowex 50 WX 4 200 - 400 mesh, Tris
Sigma, München	1-NA, 1-Thyroxin
Merck, Darmstadt	alle anderen Chemikalien

3.1.2. Radiochemikalien

Amersham	^{3}H-cAMP 38 Ci/mmol, ^{3}H-DHA 59 Ci/mmol ^{3}H-NA 36 Ci/mmol,
New Englang Nuclear	^{14}C-cAMP 45 Ci/mmol

3.1.3. Lösungen

Alkalisches Cu-Reagenz: (für Proteinbestimmung nach Lowry (43))	$CuSO_4$ 1%	1.0 ml
	K-Na-tartrat 2.7%	1.0 ml
	$NaCO_3$ 2% in 0.1 N NaOH	100.0 ml
Bray-Szintillator:	2,5 Diphenyl-oxazol	7.6 g
	Naphtalin	120.0 g
	Ethylenglykol	40.0 ml
	Methanol	200.0 ml
	Dioxan	1760.0 ml
Toluol-Szintillator:	2,5 Diphenyl-oxazol	10.9 g
	Ethylenglykol-monomethylether	730.0 ml
	Toluol	2000.0 ml

Krebs-Ringer-Medium:	NaCl	122.0 mM
	D-Glucose	10.0 mM
	$NaHCO_3$	25.0 mM
	KCl	3.0 mM
	KH_2PO_4	0.4 mM
	$MgSO_4$	1.2 mM
	$CaCl_2$	1.3 mM
	in dem. Wasser	

3.2. Geräte

Apple II plus	Apple Computer International
Cellulosenitratmembran-filter BA 85	Schleicher & Schüll, Basel
Dilumatik	Braun, Melsungen
Gefriertrockenanlage Beta	Christ GmbH & Co. KG, Osterode
Gewebeschneider (McIlwain Tissue Chopper)	The Mickle Laboratory Engineering Comp., England
Glas/Glashomogenisatoren	Wheaton Company, USA
LSC Isocap 300	Searle, Heusenstamm
Photometer PM 6 mit Drucker XP 2	Zeiss, Oberkochen
Programmierbarer Rechner HP 65	Hewlett-Packard
Ultraschall-Desintegrator Sonifier	Branson Europa B.V.
Zentrifuge Variofuge S	Heraeus-Christ, Osterode
Zentrifuge Sorvall RC-5	Du Pont de Nemours, Bad Nauheim

3.3. Tiere

Ratten Sprague-Dawley, männlich	E. Jautz, Kisslegg
Ratten Sprague-Dawley, männlich	Ciba-Geigy-Tierfarm, Sisseln

Die Tiere wurden in einem thermostatisierten Raum (25°C) mit konstantem Hell-Dunkel-Rhythmus (7:00 bis 19:00 hell) gehalten. Sie erhielten Wasser und Trockenfutter (Altrumin-Standarddiät) ad libitum.

3.4. Beobachtung der Tiere während der Vorbehandlung

Die Tiere wurden täglich gewogen. Ihre Aktivität und Aggressivität beim Sondieren, als auch im Käfig zueinander und im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur Wasser erhielten, wurde notiert. Ebenfalls wurde auf Besonderheiten bei den Ausscheidungen (Diarrhoe, Speichelfluß) geachtet.

3.5.1. Vorbehandlung der Tiere mit den Antidepressiva, bzw. mit T4 oder TRH

Die wässrigen Lösungen wurden - wenn nicht anders erwähnt - mit einer Schlundsonde (oral) zwischen 8:00 und 11:00 verabreicht. Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge Wasser.

Tiere, mit einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 140 g, wurden 9 Tage lang mit der betreffenden wässrigen AD-Lösung (0.5 ml/100g) vorbehandelt. Die tägliche Dosis betrug in der Regel 30 mg/kg Körpergewicht (6 mg/ml). Ca. 24 Std. nach der letzten Arzneistoffgabe wurden die Tiere durch decapitieren getötet.

Amoxapin wurde in leicht saurem, wässrigen Milieu (pH 5-6), Lofepramin und Trimipramin als 2%ige Tylose MH 300 Suspension verabreicht. Protriptylin wurde auch mit einer täglichen Dosis von 10 mg/kg getestet. Die entsprechende Konzentration der Lösung betrug 2mg/ml (0.5 ml/100g). Dosulepin wurde auch in einer Dosis von 45 mg/kg (0.25 ml/100g) i.p. verabreicht.

In weiteren Versuchsreihen wurden die gleichen Experimente bereits eine Std., bzw. ca. 24 Std. nach einer einmaligen Arzneistoffgabe durchgeführt.

Die wässrige T4-Lösung wurde bei der Herstellung zum Lösen des Thyroxins mit wenig NaOH versetzt (pH 8) und anschließend wieder neutralisiert. Die verschieden konzentrierten T4-Lösungen für die Untersuchung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung in 4.8.3. wurden alle auf 0.25 ml/100 g Körpergewicht zur s.c. Injektion eingestellt.
TRH wurde mit einer Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht (100 µg/ml = 0.5 ml/100 g) oral verabreicht.

3.5.2. Vorbehandlung der Tiere mit Oxaprotilin für ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmestudien am Herzen der Ratte

Die wässrigen Lösungen von (±), (+) und (-)-Oxaprotilin wurden den Tieren wie in 3.5.1. beschrieben mit einer Dosis von 30mg/kg Körpergewicht (0.5 ml/100 g) oral gegeben.
In einer Versuchsreihe wurden die Tiere w.o. ca. 24 Std. nach der letzten Arzneimittelgabe einer 9 tägigen Vorbehandlung getötet. In weiteren Experimenten erhielten Tiere einmalig eine Dosis des Arzneistoffes 2 Std. vor der Decapitation. 1 Std. vor dem Töten erhielten alle Tiere 100 µCi/kg ^{3}H-NA (100 µl Lösung/100 g) in die Schwanzvene injiziert.
Die Tiere wurden wie in 3.6. beschrieben getötet, das Herz entnommen und (in einem Plastikgefäß) sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.
Die weiteren Untersuchungen über die Aufnahme von ^{3}H-NA in das Herz der Versuchstiere wurden in den Laboratorien der Ciba-Geigy AG, Basel durchgeführt.

3.6. Präparation der Gehirnteile

Nach dem Wägen wurden die Tiere durch Decapitation getötet, die Schädeldecke mit einer Schere entlang der Pfeil- und der Lambdanaht aufgeschnitten, die Schläfenbeine, Stirn- und Hinterhauptsbeinhälften zurückgeklappt und das Gehirn mit einem Hirnspatel entnommen. Dabei wurde das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt und das Großhirn in eiskaltem Krebs-Ringer-Medium gewaschen. Für die Untersuchungen wurde nur die Cortex verwendet.

Das Großhirn wurde auf einer eisgekühlten Metallplatte mit Hilfe einer Rasierklinge und einer flach, sowie einer stark gebogenen Irispinzette weiterpräpariert. Zur Präparation der Gehirnrinde wurde das Großhirn durch einen Längsschnitt mit der Rasierklinge in die beiden Hemisphären zerlegt, die verschiedenen Gehirnstrukturen von innen abgehoben und abschließend die myelinreiche weiße Corpus Callosum-Schicht abgezogen.

3.7. Inkubation der Gehirnschnitte

Die frei präparierte Cortex wurde auf einer eisgekühlten Kunststoffunterlage flach angedrückt und mit einem Gewebeschneider in 260 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden mit einem Spatel in ein Becherglas mit 30 ml eines Carbogen belüfteten Krebs-Ringer-Mediums überführt (37°C). Die Zeit zwischen dem Töten der Tiere und dem Beginn der ersten Inkubation betrug ca. 5 Min.

Nach 10 Min. unter ständiger leichter Carbogenbegasung wurde der überstehende Puffer abgesaugt, die Schnitte durch mehrmaliges, vorsichtiges Aufsaugen und Wiederausstossen mit einer Pasteurpipette (lichte Weite ca. 2 mm) getrennt, zweimal mit 50 ml warmen Krebs-Ringer-Puffer gewaschen, mit 30 ml Krebs-Ringer-Puffer aufgefüllt und weitere 40 Min. inkubiert. Nach dieser Zeit wurde erneut einmal gewaschen und nochmals 10 Min. inkubiert, der überstehende Puffer dann abgesaugt und die Schnitte mit der oben erwähnten Pasteurpipette in die Reaktionsgefäße überführt.

Als Reaktiosgefäße dienten Zentrifugengläser mit rundem Boden, die 1.8 ml Krebs-Ringer-Puffer und 0.2 ml 6 mM Ascorbinsäurelösung (basal), bzw. 0.2 ml 1 mM NA in 6 mM Ascorbinsäurelösung (stimuliert) enthielten. Die Reaktionsgefäße wurden 5 Min. bei 37°C vorgewärmt, mit 3-4 Tropfen der Gehirnschnittsuspension (ca. 3 mg Protein) versetzt und 10 Min. inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1.0 ml eiskalter 0.4 N $HClO_4$, sofortiges kräftiges Schütteln und Einstellen in Eis gestoppt. Nach Beendigung aller Inkubationen wurden die Reaktionsgefäße zur Ausbeutebestimmung (siehe 3.9.) mit 1.0 nCi ^{14}C-cAMP versetzt, nochmals geschüttelt und 15 Min. bei 3500 x g zentrifugiert. Überstand und Sediment wurden getrennt weiterverarbeitet (vgl. 3.8. und 3.11.).

Alle Inkubationen wurden im Wasserbad bei 37°C ± 1°C durchgeführt. Die Stärke der Carbogenbegasung war dabei so eingestellt, daß die Gehirnschnitte ständig leicht bewegt wurden.

3.8. Säulenchromatographische Reinigung des cAMP

Der saure Überstand von 3.7. wurde mit Tris neutralisiert (ca. 150 µl 3 M Tris) und auf Ionenaustauschersäulen aufgetragen (Dowex 50 XW 4 200 - 400 mesh, 6 x 40 mm). Die Säulen wurden mit 1.0 ml dem. Wasser gewaschen und mit 4.0 ml dem. Wasser eluiert. Das Eluat wurde gefriergetrocknet.

Zur Wiederverwendung der Säulen wurden diese mit 10 ml 1 N HCl regeneriert und mit ca. 200 ml dem. Wasser gewaschen. Nach etwa 10 Elutionen war die Austauschkapazität so weit erschöpft, daß neue Säulen verwendet werden mußten.

3.9. Bestimmung der Ausbeute

Durch die säulenchromatographische Reinigung des cAMP geht von jeder Probe ein von der Säule abhängiger, unterschiedlicher Prozentsatz des zu bestimmenden cAMP verloren. Um die Ausbeute an cAMP jeder Probe zu ermitteln, wurde das Lyophilisat von 3.8. in 1.0 ml 0.04 M Acetatpuffer, pH 4.0 gelöst und ein Aliquot von 0.6 ml in Szintillationsgläschen pipettiert, mit 7 ml Brayszintillatorlösung versetzt und die ^{14}C-cAMP-Menge im LSC gezählt.

Zu jeder Versuchsreihe wurden mindestens drei ^{14}C-cAMP-Standard- und zwei Leerwerte gezählt. Sowohl die Standard- als auch die Leerwerte enthielten wie die Proben 0.6 ml 0.04 M Acetatpuffer, pH 4.0.
Die Ausbeute wurde gemäß der Formel

$$\text{Prozent Ausbeute} = \frac{100 \times (\text{cpm Probe} - \text{cpm Leerwert}) \times \mu\text{l Lösungsvolumen}}{(\text{cpm Standard} - \text{cpm Leerwert}) \times \mu\text{l Aliquotvolumen}}$$

berechnet. Durchschnittlich lag sie bei 70 - 90%.

3.10. Quantitative Bestimmung von cAMP

Die Bestimmung des cAMP-Gehaltes erfolgte mit dem Isotopenverdünnungstest nach Gilman (24).

3.10.1. Prinzip

Der Test beruht auf dem Konkurrenzverhalten zwischen Tritium markiertem und dem in der Probe enthaltenem cAMP um die spezifische Bindung an die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase. Hierzu wird eine stets gleichbleibende Menge ^{3}H-cAMP, die der Sättigungskonzentration des eingesetzten Bindungsproteins entspricht, zusammen mit einer Probe unbekannten cAMP-Gehaltes mit dem Bindungsprotein inkubiert. Die Inkubationszeit beträgt ca. 12 Std. bei 0°C. Bei dem pH-Wert von 4.0 (Acetatpuffer des Lyophilisates aus 3.8.) bindet das cAMP sehr labil an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase.
Die Trennung des Protein-cAMP-Komplexes von freier Radioaktivität durch Adsorption an Cellulosenitratmembranfilter erfolgt bei einem pH-Wert von 6.5, bei dem der Protein-cAMP-Komplex stabiler ist und damit gewährleistet, daß das in der Inkubationszeit erreichte Bindungsgleichgewicht zwischen markiert und unmarkierten cAMP erhalten bleibt. Die Menge gebundener Radioaktivität wird durch den LSC ermittelt.
Der Gehalt an cAMP der unbekannten Probe kann anhand parallel inkubierter Eichgeraden ermittelt werden.

3.10.2. Durchführung des Gilman-Tests

Folgende Lösungen wurden in Einmalreagenzgläser (Polystyrol 3.5 ml) pipettiert:

Standardkurve:

"Mix"	cAMP-Lösung (0.5 pmol/ 1)	Wasser	gesamte cAMP-Menge
20 µl	0 µl	20 µl	0.8 pmol
20 µl	1 µl	19 µl	1.3 pmol
20 µl	2 µl	18 µl	1.8 pmol
20 µl	4 µl	16 µl	2.8 pmol
20 µl	8 µl	12 µl	4.8 pmol
20 µl	10 µl	10 µl	5.8 pmol
20 µl	15 µl	5 µl	8.3 pmol
20 µl	20 µl	0 µl	10.8 pmol

Proben:

"Mix"	Probelösung	Wasser	gesamte cAMP-Menge
20 µl	10 µl	10 µl	?
20 µl	20 µl	0 µl	?

Der zugegebene "Mix" besteht aus 125 mM Acetatpuffer, pH 4.0 und soviel ^{3}H-cAMP, daß in den zugegebenen 20 µl 0.8 pmol ^{3}H-cAMP enthalten sind (abhängig von der spez. Aktivität des Tritium markierten cAMP).

Nach dem Abkühlen im Eisbad wurden alle Gläschen mit der gleichen Menge Bindungsprotein (7 µl = 6 µg) versetzt und bei 0°C inkubiert (12 Std.). Die Bindungsproteinmenge ist so gewählt, daß das Protein mit 0.8 pmol ^{3}H-cAMP gerade gesättigt ist. Je Testreihe wurden außerdem zwei Ansätze mit hitzedenaturiertem Bindungsprotein als Leerwert inkubiert.

Die Testansätze wurden nach der Inkubation mit 0.8 ml eisgekühltem 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5 verdünnt, das gesamte Volumen durch mit Kaliumphosphatpuffer gewaschene Cellulosenitratmembranfilter abgesaugt und mit 4 ml eisgekühltem Kaliumphosphatpuffer nachgewaschen (alles bei 0°C). Die Filter wurden in Szintillationsgefäße gelegt, im Trockenschrank bei 80°C 1 Std. getrocknet, nach dem Abkühlen in 7 ml Toluolszintillatorlösung aufgelöst und im LSC gezählt. Je Testreihe wurden mindestens fünf Eichgeraden parallel inkubiert.

Die Berechnung der Eichgeraden erfolgt mit einem doppellogarithmischen Regeressionsprogramm auf einem programmierbaren Taschenrechner.

3.11. Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry

Das Sediment von 3.7. wurde in 0.6 ml Na-Desoxycholatlösung (2.5% in 0.5 N NaOH) gelöst und danach die Lösung mit einer Pasteurpipette in ein tariertes Einmalreagenzglas (Polystyrol 7 ml) überführt. Das Zentrifugenglas wurde mit ca. 3 ml dem. Wasser nachgespült, die vereinigten Lösungen gewogen und bis zur Proteinbestimmung verschlossen bei 0°C aufbewahrt.

Je 50 µl Probenlösung plus 50 µl dem. Wasser bzw. 100 µl Probenlösung wurden mit 5.0 ml alkalischem Cu-Reagenz versetzt, umgeschüttelt und eine Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 ml Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (1:2 mit dem. Wasser verdünnt) wurde sofort umgeschüttelt und nach weiteren 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 720 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Parallel wurden je nach Umfang der Messung mehrere Eichgeraden mit 10 - 150 µg Rinderserumalbumin/Probe gemessen.

Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe eines linearen Regressionprogramms mit einem Apple II plus-Computer.

3.12. Bestimmung der Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin in Gehirnrindenschnitten der Ratte

3.12.1. Prinzip

In Krebs-Ringer-Medium bei 37°C mit Carbogen begaste, inkubierte Gehirnschnitte nehmen NA aus dem Medium in das präsynaptische Nervenende auf. Gibt man in dieses Medium radioaktiv markiertes NA hinzu, kann man nach Waschen und Homogenisation der Schnitte und anschließendem Zentrifugieren die Menge an aufgenommenen ^{3}H-NA über die Radioaktivität eines Aliquots des Überstandes messen.

3.12.2. Inkubation der Hirnrindenschnitte

Die Präparation und Inkubation der Hirnrindenschnitte bis einschließlich der 40 Min. Inkubation erfolgte wie in 3.6. und 3.7. beschrieben. Nach der 40 Min. Inkubation wurde das überstehende Krebs-Ringer-Medium abgesaugt und die Schnitte mit der beschriebenen Pasteurpipette auf 8 - 10 kleine Bechergläser verteilt, die 5 Min. bei 37°C vortemperiert wurden. Das Becherglas für den Kontrollwert enthielt 5 ml Krebs-Ringer-Medium, die restlichen Bechergläser 4,5 ml plus 0.5 ml der jeweiligen AD-Konzentration.

Die Reaktion wurde nach 10 Min. Vorinkubation durch Zugabe von 100 µl einer ^{3}H-NA-Lösung gestartet (100 µl Lösung enthielten 0.5 µCi = 100 pmol NA, entsprechend 20 nM NA Endkonzentration).
Vorarbeiten von W. Schocker zeigten, daß die NA-Aufnahme innerhalb eines Zeitintervalls von 2 - 8 Min. linear verläuft (63).

Das radioaktive Medium wurde nach 5 Min. Inkubationszeit auf einem Büchnertrichter abgesaugt und unmittelbar darauf wurden die Schnitte 4 mal mit je 10 ml eiskaltem Krebs-Ringer-Puffer gewaschen, um an den Schnitten verbliebenes radioaktives Material wegzuspülen.
Die Hirnschnitte wurden mit einem Spatel in Handhomogenisatoren überführt, mit 1 ml eiskalter 5%iger TCA versetzt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann mit einer Pasteurpipette in Zentrifugengläser überführt und bei 3000 x g, 10 Min. zentrifugiert (Variofuge S). Der klare Überstand wurde abpipettiert und ein Aliquot von 0.5 ml in einem Szintillationsgläschen mit 7 ml Brayszintillatorlösung im LSC gezählt.

Durch die TCA kam es zu Quencherscheinungen. Zum Ausgleich der cpm-Ausbeute wurde der Quotient zwischen dem Kanalverhältnis des Standards und der gemessenen Probe als Korrekturfaktor in die Berechnung der IC_{50} Werte einbezogen.
Die Proteine wurden wie in 3.11. beschrieben bestimmt.

3.13 Dihydroalprenololbindungstest

Der Test wurde modifiziert nach Bylund und Snyder durchgeführt (10).

3.13.1. Präparation der Gehirnteile

Die Tiere wurden durch decapitieren getötet und die Cortex wie beschrieben präpariert. Nach dem Schneiden der Cortex mit dem Gewebeschneider wurden die Schnitte in 5 ml Puffer (48 mM Tris-HCl pH 7.4, 12 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA) in einem Glashomogenisator bei 0°C homogenisiert (ca. 25 Schläge) und das Homogenisat 15 Min. bei 1100 x g, 0°C zentrifugiert (Variofuge S). Das Sediment wurde in 10 ml einer eisgekühlten 1 mM $KHCO_3$-Lösung resuspendiert und 20 Min. bei 12000 x g, 0°C zentrifugiert (Sorvall RC-5). Danach wurde das Sediment in 5 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0 nochmals fein homogenisiert, der Proteingehalt der Suspension bestimmt und mit dem Puffer auf 2 mg/ml eingestellt.

3.13.2. Durchführung des Tests

Ein Inkubationsansatz (1 ml) enthielt 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0, ^3H-DHA (0.7 - 16.0 nM) und 1 mg Protein. Die Ansätze zur Bestimmung der unspezifischen Bindung enthielten zusätzlich 10 µM Propanolol-HCL.

Nach 5 Min. Vorinkubation bei 25°C wurde die Reaktion mit radioaktivem DHA gestartet und nach 20 Min. durch Absaugen und Waschen mit 5 ml eisgekühltem 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0 durch Whatman GF/B-Filter beendet. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml eiskaltem Puffer gewaschen und eine Std. bei 80°C getrocknet. Die Radioaktivität wurde nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator mit LSC gemessen.

Die spezifisch an die beta-adrenergen Rezeptoren gebundene DHA-Menge wurde als Differenz der Proben mit und ohne Propanolol berechnet. Von jeder verwendeten DHA-Konzentration wurden 0.1 ml auf ein Filter pipettiert, der Filter getrocknet und gezählt. Die so erhaltenen Standardwerte dienten als Bezugspunkte zur Umrechnung von cpm-Werten in fmol DHA.

Alle Inkubationen und Verdünnungen wurden in Polypropylen-Einweggefäßen durchgeführt, die in Versuchen von Türck die geringste Adsorptionsrate für DHA zeigten (76). Ebenfalls zeigten die Versuche von Türck, daß das Einfrieren der Gehirnteilpräparationen nur einen geringen Einfluß auf die DHA-Bindung in der Cortex besitzt (76). In den durchgeführten Versuchen wurde bei -70°C eingefrorenes Gewebematerial verwendet.

3.14. Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit einem programmierbaren Taschenrechner (HP 65) und einem Apple II plus Computer.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert + mittlerer Fehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Die jeweils letzte Dezimalstelle ist gerundet.

Einzelwerte, die nach dem Ausreissertest nach Nalimov mit 99.9%iger Wahrscheinlichkeit nicht der Grundgesamtheit angehören, wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

Die Anzahl der Versuche ist in Klammern hinter dem S.E.M. angegeben. Diese Zahl ist jeweils die Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche und nicht die Anzahl der Einzelexperimente. Für jedes Versuchstier wurden stets Mehrfachbestimmungen durchgeführt und die daraus errechneten Mittelwerte als ein Ergebnis gewertet.

Die statistischen Signifikanzgrenzen wurden mit dem Student's t-Test errechnet.

4. Ergebnisse

4.1.1. Motorische Aktivität der Tiere während der Vorbehandlung

1974 stellten Skolnick und Daly (68) anhand von vier verschiedenen Rattenstämmen eine negative Korrelation zwischen spontaner (motorischer) Aktivität und NA stimulierter cAMP-Bildung in der Cortex fest.
Im Hinblick auf die reduzierte cAMP-Bildung in der Cortex nach einer AD-Behandlung war es von Interesse die Aktivität der Tiere zu beobachten.

W. Schocker stellte eine umfassende Korrelationsuntersuchung zwischen einer Imipramin-Behandlung und der motorischen Aktivität der Tiere auf (63). Es zeigte sich, daß bereits nach einmaliger IMI-Gabe eine gewisse, nicht signifikante Verringerung der motorischen Aktivität zu sehen ist, die bis zum 3. Behandlungstag die Signifikanzschranke erreicht. Eine Gewöhnung wird ab dem 4. Tag festgestellt, mit weiterhin deutlicher Tendenz zu verminderter motorischer Aktivität; die Signifikanzschwelle wird jedoch nicht mehr überschritten.

Diese Untersuchungen wurden hier nicht durchgeführt. Es wurde die Aktivität der Tiere in gewissen Zeitabständen beobachtet, sowie ihr Verhalten beim Sondieren notiert. Diese Beobachtungen zeigen eine annähernde Bestätigung der Ergebnisse von Schocker (63). Die AD-behandelten Tiere verhielten sich bereits beim zweiten Sondieren deutlich ruhiger im Vergleich zu Kontrolltieren. In den folgenden Tagen wurden die Tiere eher noch ruhiger, ab dem 5.-6. Tag jedoch wieder lebhafter und danach konnte kein Unterschied mehr zu den Kontrolltieren festgestellt werden, die im Laufe der Behandlung ebenfalls Gewöhnung an den Sondiervorgang zeigten.

Bei der Beobachtung des Verhaltens der Tiere im Käfig untereinander konnte kein Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Auch bei den Körperausscheidungen der Tiere wurden keine Abweichungen (Diarrhoe, Speichelfluß etc.) beobachtet.

4.1.2. Gewichtszunahme der Tiere während der Vorbehandlung

Die durchschnittliche Gewichtszunahme der mit Wasser sondierten Kontrolltiere betrug 7 g/Tag (140-200 g), der mit den unterschiedlichen AD behandelten Tiere 5,2 g/Tag (140-188 g).

In Abb.4.1. ist die prozentuale Gewichtszunahme der behandelten Tiergruppen für jedes untersuchte AD aufgetragen, wobei die Gewichtszunahme der jeweiligen Kontrollgruppe als 100% gewertet wurde. Dies erklärt die hohen Prozentdifferenzen. Im Durchschnitt zeigten behandelte Tiere 20% weniger Gewichtszunahme.

Im Histogramm der Abb.4.1. sind die Balken der AD, bei denen keine, bzw. nur eine nicht signifikante Tendenz zu verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit festgestellt werden konnte (siehe 4.2.), schwarz gezeichnet. Es läßt sich offensichtlich keine Korrelation zwischen einer veränderten Gewichtszunahme während der Vorbehandlung mit einem AD und der Fähigkeit dieses Arzneistoffes zur Änderung der adrenergen Rezeptorempfindlichkeit aufstellen.

Clomipramin und Maprotilin behandelte Tiere, die signifikante adrenerge Subsensitivität entwickelten, zeigten mehr Gewichtszunahme als die entsprechenden Kontrolltiere. Bei weiteren positiv wirksamen AD war die Gewichtszunahme nahezu identisch mit der entsprechender Kontrolltiere. Im Gegesatz dazu nahmen mit, in den durchgeführten Versuchen unwirksamen AD (Dosulepin, (±)-Mianserin, Noxiptylin) behandelte Tiere z.T. weniger zu.

Tests auf Signifikanz ergaben für einige Versuchsreihen Werte oberhalb der Signifikanzschranke. Diese Signifikanzwerte sind objektiv ohne Aussagewert, da die für diese Beobachtungen zu Grunde liegenden psychischen und physischen Faktoren statistisch nicht zu erfassen sind.

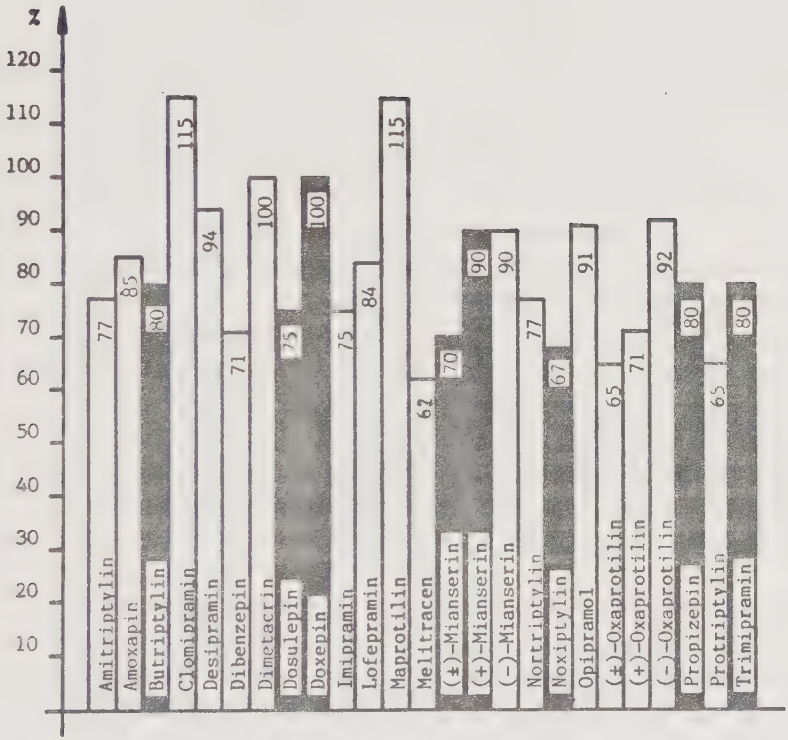


Abb.4.1. Prozentuale Gewichtszunahme der Tiere während der Vorbehandlung. Die Gewichtszunahme der zugehörigen Kontrolltiere wurde als 100% gerechnet. Das durchschnittliche Anfangsgewicht der Tiere betrug 140 g.

(Die schwarz gezeichneten Balken entsprechen den AD, die in den Versuchen keine signifikante adrenerge Subsensitivität induzierten)

4.2. Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit nach Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva unterschiedlicher chemischer Struktur

Die psychotrope Grundwirkung trizyklischer Substanzen basiert auf der Ringanordnung deren Topographie durch die sterischen Verhältnisse des zentralen Ringes festgelegt wird (83,84). Die Stereochemie eines Trizyklus läßt sich durch den Biegungswinkel $\measuredangle$ (der Schnittwinkel der Ebenen A1 und A2), den Annellierungswinkel ß (in welchem die beiden Aromaten an den zentralen Ring annelliert sind), den Torsionswinkel γ (durch den das Grundgerüst aus der symmetrischen Lage gedreht ist) und die Distanz δ (der Abstand der Mittelpunkte beider Aromaten) beschreiben (Abb.4.2.a und 4.2.b). Bestimmend für die antidepressive Wirkung von Trizyklen sind primär der Biegungswinkel $\measuredangle$ sowie untergeordnet der Torsionswinkel γ . Der Annellierungswinkel ß kann in dieser Substanzklasse ohne Verlust der Hauptwirkung in weiten Bereichen variiert werden (83).

Ebenfalls von zentraler Bedeutung für die antidepressive Wirkung eines Trizyklus ist die Lage des basischen Zentrums der Seitenkette zum trizyklischen Grundgerüst. Unter der Annahme, daß sowohl der Trizyklus als auch die Seitenkette an einen Rezeptor binden und die Seitenkette die Konstellation bevorzugt, bei der sich die einzelnen Atome am wenigsten beeinflußen, konnte für die AD eine hypothetische Konstellation der Seitenkette festgelegt werden (83), die in Abb.4.3. wiedergegeben ist.

In dieser Versuchsreihe erhielten Ratten wie beschrieben 9 Tage AD verabreicht, deren chemische Struktur Variationen in der Seitenkette als auch im trizyklischen Grundgerüst aufweisen. Bei allen getesteten Arzneistoffen handelt es sich um Substanzen, deren antidepressive Wirkung als gesichert angesehen wird. Nach dieser Vorbehandlung wurde die mögliche Entwicklung einer veränderten adrenergen Rezeptorempfindlichkeit in der Gehirnrinde der Versuchstiere untersucht.

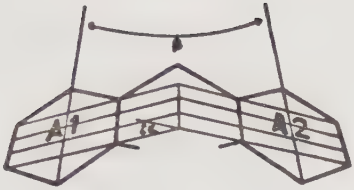


Abb.4.2.a Sterische Parameter (83)
Biegungswinkel α , Annellierungswinkel ß

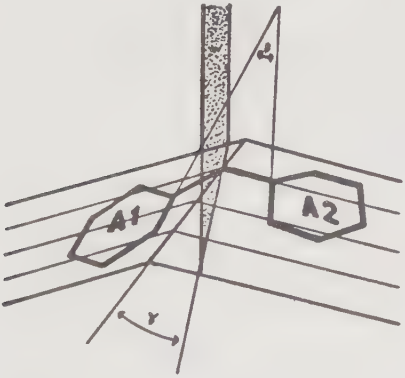


Abb.4.2.b Sterische Parameter (83)
Annellierungswinkel ß, Torsionswinkel γ

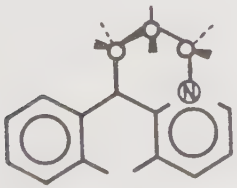


Abb.4.3. Hypothetische Konstellation der Seitenkette für eine antidepressive Wirkung (83)

4.2.1. Variation der Seitenkette und Substitution eines Aromaten

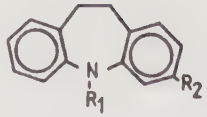
Es wurden Derivate der zwei wichtigsten AD-Gruppen, der Dibenzazepine und der Dibenzozykloheptadiene getestet.
In Abb.4.4. sind die trizyklischen Grundgerüste des Dibenzazepins und des Dibenzozykloheptadiens, sowie die veränderten Seitenketten der Derivate aufgezeichnet.

Beide Grundgerüste besitzen einen Biegungswinkel α von 55°, und einen Torsionswinkel γ von 20° . Der Abstand der Aromatenzentren beträgt 5,1 Å. Im Iminodibenzyl sind die beiden Aromaten in einem Winkel von 40° an den zentralen Ring annelliert; beim Dibenzozykloheptadien beträgt dieser Winkel 30° (83). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe erlauben daher eine Aussage über einen Einfluß der Seitenkette, bzw. der Substitution eines Aromaten (Clomipramin) auf die durchgeführten Untersuchungen (Tab.4.1.).

Tab.4.1. Einfluß der AD-Behandlung auf die basale (obere Reihe) und die durch 0.1 mM NA stimulierte cAMP-Bildung (untere Reihe) in Gehirnrindenschnitten der Ratte
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

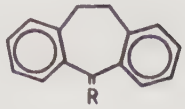
Kontrolltiere	Pharmakon	behandelte Tiere	2p <
13.5 ± 1.1 (15)	Amitriptylin	10.5 ± 0.7 (12)	
39.8 ± 1.8 (15)		24.9 ± 1.0 (12)	0.001
14.1 ± 0.6 (11)	Butriptylin	13.9 ± 0.3 (12)	
32.9 ± 2.6 (11)		26.7 ± 1.2 (12)	n.s.
15.2 ± 1.2 (8)	Clomipramin	15.6 ± 1.4 (9)	
43.9 ± 5.0 (8)		28.3 ± 3.3 (9)	0.01
13.6 ± 0.8 (5)	Desipramin	11.3 ± 1.3 (6)	
42.5 ± 2.9 (5)		30.2 ± 2.9 (6)	0.01
14.1 ± 0.9 (14)	Imipramin	13.4 ± 0.8 (11)	
41.1 ± 3.7 (14)		27.1 ± 2.2 (11)	0.01
13.5 ± 1.0 (15)	Lofepramin	10.7 ± 0.6 (14)	
39.8 ± 1.8 (15)		23.0 ± 1.5 (14)	0.001
14.1 ± 0.8 (15)	Nortriptylin	14.4 ± 0.9 (13)	
44.6 ± 2.4 (15)		35.5 ± 2.2 (13)	0.02
13.7 ± 0.6 (16)	Noxiptylin	16.4 ± 0.8 (15)	
44.4 ± 2.4 (16)		44.1 ± 2.6 (15)	n.s.
15.7 ± 1.1 (13)	Trimipramin	13.6 ± 1.0 (12)	
46.8 ± 3.0 (13)		42.9 ± 2.5 (12)	n.s.

Dibenzazepine



	R_1	R_2
Imipramin	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	-H
Desipramin	$-(CH_2)_3-NHCH_3$	-H
Lofepramin	$-(CH_2)_3-N(CH_3)-CH_2-CO-C_6H_6-Cl$	-H
Trimipramin	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$	-H
Clomipramin	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$	-Cl

Dibenzozykloheptadiene



R	
$=CH-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	**Amitriptylin**
$=CH-(CH_2)_2-NHCH_3$	**Nortriptylin**
$=N-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$	**Noxiptylin**
$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$	**Butriptylin**

Abb.4.4. Seitenketten der Dibenzazepin- und Dibenzozykloheptadien-Derivate

Ausgehend vom Imipramin mit seiner Dimethylaminopropyl-Seitenkette zeigte sich, daß eine Demethylierung am basischen Stickstoff (Desipramin) ohne nachteilige Auswirkung auf die Fähigkeit der Substanz zur Entwicklung adrenerger Subsensitivität ist. Das gleiche Ergebnis wurde bei den Dibenzozykloheptadienen erhalten (Demethylierung von Amitriptylin zu Nortriptylin). Gleiche Ergebnisse sind bereits von anderen Autoren beschrieben worden (siehe Übersichtsarbeiten 11,52,70,73).

Auch die Substitution einer Methylgruppe des basischen Stickstoffs durch eine p-Chloroacetophenon-Gruppe beim Lofepramin bleibt ohne negativen Einfluß auf die Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit, wie auch die Substitution eines der beiden Aromaten in 3-Stellung durch ein Chloratom (Clomipramin, Tab.4.1.).

Anders verhält es sich bei Veränderungen der Seitenkette vor dem basischen Stickstoff wie beim Dibenzozykloheptadienderivat Noxiptylin, wo die Methylidengruppe durch eine N-O-Gruppierung ersetzt wurde. Diese Substanz zeigte keinen Einfluß auf die cAMP-Bildung nach Stimulation mit NA im Vergleich zu Kontrolltieren. Dies beruht nicht auf einer mangelnden Resorption des Arzneistoffes (19,62), da eine rasche Resorption und Verteilung von Noxiptylin im gesamten Organismus, nach i.p. und oraler Gabe erfolgt.

In die gleiche Richtung deuten Ergebnisse mit dem Dibenzazepin Trimipramin und dem Dibenzozykloheptadien Butriptylin. Beide Substanzen besitzen statt der üblichen Propyl- eine Isobutyl-Gruppe vor dem basischen Stickstoff der Seitenkette, und beide Arzneistoffe zeigten keine signifikante Wirkung im Hinblick auf die adrenerge Sensitivität.

Keines der in dieser Versuchsreihe getesteten AD zeigte nach 9 tägiger Gabe einen Einfluß auf die basale cAMP-Bildung.

4.2.2. Variationen des zentralen Ringes im trizyklischen Grundgerüst

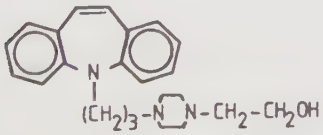
Variationen des zentralen Ringes im trizyklischen Grundgerüst ziehen beträchtliche Veränderungen der fixierenden Winkel für das Grundgerüst mit sich und können dadurch für die Reaktion eines Arzneistoffes mit einem Rezeptor von Bedeutung sein.
Da in dieser Arbeit nur Arzneistoffe getestet wurden, die bereits als AD in klinischer Anwendung sind, war es nicht möglich, Substanzen zu vergleichen, die nur Änderungen im zentralen Ring aufweisen. Die für diese Arbeit verfügbaren AD variieren zusätzlich auch in der Struktur ihrer Seitenkette. Aus diesem Grund sollte in diesem Teil der Versuchsreihe die Seitenkette der untersuchten AD mit berücksichtigt werden, da sich unterschiedlich hervorgerufene Effekte überlagern könnten.

4.2.2.1. Zusätzliche ungesättigte Bindung im zentralen Ring

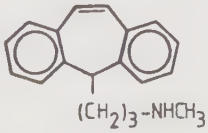
Der Einfluß einer zusätzlichen ungesättigten Bindung im zentralen Ring auf die Entwicklung einer veränderten adrenergen Rezeptorempfindlichkeit wurde an Hand des Dibenzazepins Opipramol und dem Dibenzozykloheptatriens Protriptylin untersucht.

Eventuelle Nebeneffekte der veränderten Seitenkette des Opipramol können wegen der Metabolisierung des Arzneistoffes (5,55) vernachlässigt werden. Wegen seiner verstärkten therapeutischen Wirksamkeit wurde Protriptylin neben der üblichen Dosis (30 mg/kg) in einem weiteren Versuch auch mit einer Dosis von 10 mg/kg gegeben. Die Ergebnisse sind in Tab.4.2. wiedergegeben.

Bei beiden getesteten AD hatte die zusätzliche Doppelbindung im zentralen Ring keinen nachteiligen Einfluß auf die getestete Wirkung. Protriptylin behandelte Ratten bildeten in beiden Versuchen (30 und 10 mg/kg) signifikant weniger cAMP nach Stimulation mit NA.



Opipramol



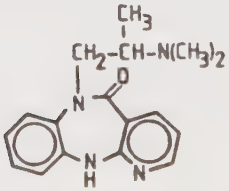
Protriptylin

4.2.2.2. Einfügen von Heteroatomen in den zentralen Azepinring

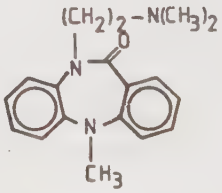
Die zwei getesteten Diazepinderivate, das Dibenzdiazepin Dibenzepin und das Pyridobenzodiazepin Propizepin unterscheiden sich nicht nur durch den annellierten Benzol-, bzw. Pyridinring und einer Methyl-Gruppe am Stickstoff in 5-Stellung, sondern auch in der Seitenkette. Dibenzepin besitzt zwischen dem Ringsystem und dem basischen Stickstoff der Seitenkette eine Ethyl-Gruppe, Propizepin dagegen eine Isopropyl-Gruppe. Bemerkenswert ist noch der doppelt gebundene Sauerstoff in 9-Stellung und die Tatsache, daß in beiden Substanzen die Seitenkette am Stickstoff in 10-Stellung gebunden ist.

Beim Dibenzoxazepin Amoxapin ersetzt ein Sauerstoff den Stickstoff in dessen üblicher 5-Position. Ein Stickstoff ist in 10-Stellung mit dem Kohlenstoff in 9-Position durch eine Doppelbindung verknüpft, an dem auch der Piperazin-Ring als 'Seitenkette' gebunden ist.
Die erhaltenen Daten der Untersuchungen sind in Tab.4.2. aufgelistet.

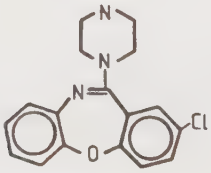
Die drastische Veränderung des Annellierungswinkels von z.B. 40° bei den Dibenzazepinen auf -30° beim Dibenzepin war ohne Einfluß, d.h. es entwickelte sich eine adrenerge Subsensitivität. Ebenso verhielt es sich mit Amoxapin. Propizepin hingegen blieb diesbezüglich ohne Wirkung. Als Grund dafür kann eine mangelnde Resorption für diese Substanz ausgeschlossen werden (46). Das negative Ergebnis mit Propizepin beruht möglicherweise auf der gleichen sterischen Behinderung der Seitenkette, wie sie für Butriptylin und Trimipramin festgestellt werden konnte (4.2.1.,Tab.4.1.).



Propizepin



Dibenzepin

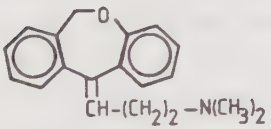


Amoxapin

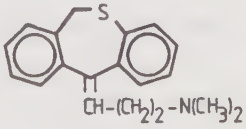
4.2.2.3. Einfügen von Heteroatomen in den zentralen Zykloheptadienring

Dosulepin besitzt in 10-Stellung ein Schwefelatom, bei Doxepin ist an gleicher Stelle ein Sauerstoffatom eingefügt.
Da bei Dosulepin eine erschwerte Passierbarkeit der Bluthirnschranke bekannt ist (55), wurde diese Substanz in einem weiteren Versuch auch in einer Dosis von 45 mg/kg i.p. verabreicht. Rasche Resorption und Verteilung wurde für Doxepin nachgewiesen (31). Die Ergebnisse der Experimente sind in Tab.4.2. angegeben.

Keine der beiden getesteten Substanzen führte in diesen Versuchen zu einer Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptoransprechbarkeit, obwohl ein Heteroatom im zentralen Ring wesentlich geringere Veränderungen der fixierenden Winkel des Grundgerüstes bewirkt, als sie bei dem in diesen Untersuchungen signifikant aktiven Dibenzdiazepin Dibenzepin festzustellen sind (83).
Ergebnisse über eine Verringerung der beta-Rezeptoren nach mehrtägiger Behandlung von Ratten, sind sowohl für Dosulepin (8,9) als auch für Doxepin (2,13) beschrieben worden. In den Versuchen dieser Arbeit hingegen zeigte Doxepin, neben Propizepin, sogar eine leichte Tendenz zu erhöhter adrenerger Rezeptoremfindlichkeit.



Doxepin



Dosulepin

Tab.4.2. Einfluß der AD-Behandlung auf die basale (obere Reihe) und die durch 0.1 mM NA stimulierte cAMP-Bildung (untere Reihe) in Gehirnrindenschnitten der Ratte
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Kontrolltiere	Pharmakon	behandelte Tiere	2p <
15.7 ± 1.1 (13)	Amoxapin	14.4 ± 0.7 (12)	
46.8 ± 3.0 (13)		29.2 ± 1.4 (12)	0.001
15.7 ± 1.1 (13)	Dibenzepin	13.9 ± 1.1 (12)	
46.8 ± 3.0 (13)		33.6 ± 1.7 (12)	0.005
18.4 ± 1.2 (13)	Dosulepin	22.2 ± 2.3 (11)	
53.8 ± 3.4 (13)	30mg/kg oral	58.0 ± 4.8 (11)	n.s.
12.5 ± 1.3 (5)	Dosulepin	12.4 ± 1.1 (5)	
29.8 ± 1.5 (5)	45mg/kg i.p.	28.0 ± 1.2 (5)	n.s.
13.8 ± 1.0 (11)	Doxepin	15.5 ± 1.4 (11)	
42.0 ± 2.4 (11)		46.1 ± 3.6 (11)	n.s.
12.8 ± 0.9 (14)	Opipramol	12.0 ± 1.0 (11)	
43.3 ± 4.1 (14)		30.0 ± 3.5 (11)	0.01
13.3 ± 0.5 (10)	Propizepin	15.7 ± 1.7 (10)	
40.1 ± 2.3 (10)		44.1 ± 3.3 (10)	n.s.
17.5 ± 2.0 (6)	Protriptylin	19.5 ± 1.7 (5)	
50.2 ± 7.6 (6)	10mg/kg	37.8 ± 3.6 (5)	0.02
14.0 ± 1.1 (11)	Protriptylin	14.1 ± 2.0 (11)	
43.3 ± 3.8 (11)	30mg/kg	27.8 ± 3.9 (11)	0.01

Wie in dem vorangegangenen Teil der Versuchsreihe hatte keines der getesteten AD einen Einfluß auf die basalen cAMP-Spiegel.

4.2.2.4. Verengung des zentralen Siebenringes zum Sechsring

Die Verengung des zentralen Siebenringes zum Sechsring führt bei den Dihydroanthracenen zu planaren Grundgerüsten. Liegt ein substituierter zentraler Sechsring vor, annellieren die beiden Aromaten unter einem Winkel von ca. 10° (83). Die in dieser Versuchsreihe getesteten AD besitzen alle eine Di-, bzw. Monomethylaminopropyl-Seitenkette, sodaß von dieser Seite keine Einflüsse zu erwarten sind.

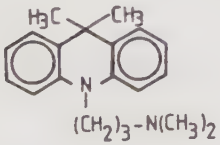
Wie in den vorangegangenen Abschnitten kann auch hier der Vergleich zwischen den beiden wichtigsten Gruppen der AD, der Dibenzazepine und der Dibenzozykloheptadiene aufrecht erhalten werden. Dabei wird das Acridanderivat Dimetacrin als Vertreter der Dibenzazepine und das Dihydroanthracenderivat Melitracen als Beispiel der Dibenzozykloheptadiene angesehen.

Von besonderem Interesse ist auch die Struktur des Maprotilin, das sowohl als trizyklisches 9,10 Ethano-Anthracen wie auch als tetrazyklisches AD angesehen werden kann. Die Ergebnisse mit diesen AD sind in Tab.4.3. wiedergegeben.

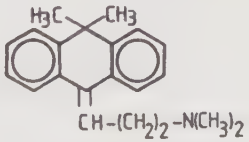
Tab.4.3. Einfluß der AD-Behandlung auf die basale (obere Reihe) und die durch 0.1 mM NA stimulierte cAMP-Bildung (untere Reihe) in Gehirnrindenschnitten der Ratte
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Kontrolltiere	Pharmakon	behandelte Tiere	2p <
15.7 ± 1.1 (13)	Dimetacrin	13.6 ± 0.6 (12)	
46.8 ± 3.0 (13)		29.2 ± 1.5 (12)	0.001
14.2 ± 0.9 (15)	Maprotilin	14.0 ± 0.9 (11)	
47.2 ± 3.9 (15)		33.3 ± 3.3 (11)	0.02
12.2 ± 0.5 (13)	Melitracen	13.1 ± 1.2 (13)	
42.1 ± 2.7 (13)		29.1 ± 2.7 (13)	0.005

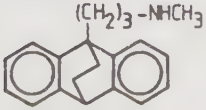
Alle drei Substanzen führten nach 9 tägiger Gabe zu einer signifikant geringeren Empfindlichkeit adrenerger Rezeptoren in der Gehirnrinde der Ratte, ohne dabei die unstimulierte cAMP-Bildung zu beeinflußen.



Dimetacrin



Melitracen



Maprotilin

4.3. Zeitliche Abhängigkeit für die Entwicklung der verminderten cAMP-Bildung nach Stimulation durch Noradrenalin

Ein wesentliches Kriterium für die Hypothese von Sulser (71,72) über den Zusammenhang der antidepressiven Wirkung und der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit war die zeitliche Korrelation der biochemischen und therapeutischen Wirkung.

Mehrere Autoren zeigten, daß die Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit nicht nach einmaliger Gabe der Arzneistoffe auftrat, sondern eine mehrtägige Behandlung für diese Entwicklung notwendig war. Gleichzeitig trat eine Abnahme der postsynaptischen adrenergen Rezeptorzahl ein (11,52,70).

Mit den folgenden Untersuchungen sollte dies auch für die in dieser Arbeit getesteten Substanzen überprüft werden.

4.3.1. Vorbehandlung von Ratten mit Antidepressiva 1 Stunde vor Versuchsbeginn

Umfangreiche Untersuchungen über den Metabolismus der einzelnen AD zeigten, daß deren Resorption und Verteilung im Organismus nach oraler, s.c. und i.p. Gabe sehr rasch verläuft. Bei Konzentrationsbestimmungen im Blut, CSF und den Organen konnten für verschiedenen AD bereits kurze Zeit (z.T. weit unter einer Std.) nach Gabe der Arzneistoffe hohe Konzentrationen festgestellt werden (7,15,20,25,30,46). Für Dosulepin wurde allerdings eine erschwerte Passierbarkeit der Bluthirnschranke nachgewiesen (55).

Generell kann man davon ausgehen, daß 1 Std. nach oraler Gabe einer Dosis von 30 mg/kg im Gehirn der Versuchstiere eine therapeutisch relevante Konzentration des Arzneistoffes vorhanden ist. In dieser Versuchsreihe erhielten Ratten wie beschrieben die AD-Lösung mit einer Schlundsonde verabreicht und wurden 1 Std. danach durch Decapitation getötet. Die Untersuchung der Cortex wurde wie in 3.6.-3.11. beschrieben durchgeführt. Da dieses Experiment in zwei großen Versuchsgruppen durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse mit den jeweils zugehörigen Kontrollen in Tab.4.4.a. und Tab.4.4.b. wiedergegeben.

Tab.4.4.a. Einfluß der AD auf die cAMP-Bildung
1 Std. nach oraler Gabe
Angabe in pmol/mg Protein x 10 Min.

Pharmakon	cAMP-Basalwert		NA-stimulierter Wert		2p <
Kontrolltiere	9.6 ± 0.4	(12)	18.2 ± 1.0	(12)	
Amitriptylin	9.1 ± 0.3	(5)	17.7 ± 1.4	(5)	n.s.
Amoxapin	9.7 ± 0.2	(5)	18.1 ± 0.7	(5)	n.s.
Clomipramin	9.4 ± 0.7	(5)	19.5 ± 2.4	(5)	n.s.
Desipramin	10.6 ± 0.6	(6)	19.5 ± 2.7	(6)	n.s.
Dibenzepin	8.9 ± 0.4	(3)	17.4 ± 1.3	(3)	n.s.
Dimetacrin	7.9 ± 0.5	(3)	17.1 ± 1.3	(3)	n.s.
Dosulepin	9.3 ± 1.3	(3)	16.9 ± 0.3	(3)	n.s.
Doxepin	7.6 ± 0.6	(3)	19.2 ± 1.9	(3)	n.s.
Imipramin	8.8 ± 1.9	(3)	19.2 ± 3.6	(3)	n.s.
Propizepin	10.7 ± 1.3	(5)	18.4 ± 2.1	(5)	n.s.

Fortsetzung: Tab.4.4.b.

Pharmakon	cAMP-Basalwert		NA-stimulierter Wert		2p <
Kontrolltiere	11.2 ± 1.7	(9)	24.8 ± 3.1	(9)	
Lofepramin	9.4 ± 0.4	(6)	24.0 ± 1.4	(6)	n.s.
Maprotilin	11.4 ± 1.4	(3)	25.4 ± 0.6	(3)	n.s.
Melitracen	10.0 ± 0.4	(5)	24.4 ± 3.3	(5)	n.s.
Nortriptylin	11.1 ± 0.5	(3)	25.5 ± 2.2	(3)	n.s.
Noxiptylin	10.8 ± 0.5	(6)	26.7 ± 1.5	(6)	n.s.
Opipramol	10.8 ± 0.8	(3)	24.8 ± 0.6	(3)	n.s.
Protriptylin	9.2 ± 0.2	(5)	22.3 ± 1.8	(5)	n.s.
Trimipramin	10.3 ± 0.6	(6)	23.4 ± 1.0	(6)	n.s.

Keines der in diesem Versuch getesteten AD zeigte innerhalb 1 Std. einen signifikanten Einfluß auf die basalen oder auf die mit NA stimulierten cAMP-Werte in der Gehirnrinde.

Unter der Annahme, mit den gegebenen Versuchsbedingungen therapeutisch relevante Arzneistoffkonzentration erhalten zu haben, zeigen die Ergebnisse keine Abhängigkeit einer veränderten cAMP-Bildung von der zum Zeitpunkt der Untersuchung existierenden AD-Konzentration. Gleiche Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren festgestellt (63,66,78).

4.3.2. Vorbehandlung von Ratten mit Antidepressiva 24 Stunden vor Versuchsbeginn

Dieser Versuch wurde wie in 4.3.1. beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die Tiere hier ca. 24 Std. nach einmaliger Arzneistoffgabe getötet wurden. Die Ergebnisse sind in Tab.4.5. wiedergegeben.

Tab.4.5. Einfluß der AD auf die cAMP-Bildung 24 Std. nach oraler Gabe
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Pharmakon	cAMP-Basalwerte	NA-stimulierte Werte	2p <
Kontrolltiere	10.0 ± 0.4 (12)	19.5 ± 1.0 (12)	
Amitriptylin	11.5 ± 1.0 (6)	21.9 ± 1.3 (6)	n.s.
Amoxapin	9.8 ± 0.9 (6)	18.6 ± 1.6 (6)	n.s.
Clomipramin	9.8 ± 0.9 (5)	19.8 ± 0.6 (5)	n.s.
Desipramin	10.8 ± 0.9 (6)	19.7 ± 1.2 (6)	n.s.
Dibenzepin	11.3 ± 2.3 (6)	22.3 ± 4.2 (6)	n.s.
Dimetacrin	10.3 ± 0.4 (5)	18.0 ± 0.8 (6)	n.s.
Dosulepin	10.1 ± 1.1 (6)	20.0 ± 1.1 (6)	n.s.
Doxepin	10.2 ± 1.4 (5)	18.3 ± 2.9 (5)	n.s.
Imipramin	10.0 ± 0.7 (9)	17.6 ± 1.8 (9)	n.s.
Lofepramin	10.0 ± 0.7 (6)	18.7 ± 1.7 (6)	n.s.
Maprotilin	10.0 ± 0.6 (5)	19.8 ± 2.1 (5)	n.s.
Melitracen	10.2 ± 1.0 (4)	17.5 ± 1.3 (4)	n.s.
Nortriptylin	9.1 ± 1.3 (4)	21.4 ± 1.8 (4)	n.s.
Noxiptylin	10.1 ± 0.7 (6)	20.2 ± 1.4 (6)	n.s.
Opipramol	9.4 ± 1.1 (5)	19.7 ± 4.1 (5)	n.s.
Propizepin	11.4 ± 0.6 (6)	21.0 ± 2.9 (6)	n.s.
Protriptylin	9.8 ± 1.0 (6)	21.2 ± 2.3 (6)	n.s.
Trimipramin	11.5 ± 1.4 (6)	21.1 ± 3.8 (6)	n.s.

Wie in 4.3.1. zeigte keines der getesteten AD einen signifikanten Einfluß auf die basalen oder die NA-stimulierten cAMP-Werte.
Die geringen cAMP-Spiegel der Basal- und der NA-stimulierten Werte beruhen wahrscheinlich auf jahreszeitlichen Schwankungen im Stoffwechsel der Versuchstiere. Die o.g. Versuche wurden während der Sommermonate durchgeführt, in denen schon häufig eine verringerte Ansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren beobachtet wurde (Schultz, Türck, pers. Mitteilung).

4.4. Stereospezifität der Antidepressiva-Wirkung

Die Isolierung optischer Isomere der AD Mianserin und Oxaprotilin, einem 2'-Hydroxy Derivat des Maprotilin, ermöglichte es zu prüfen inwieweit die untersuchte Wirkung dieser Substanzen stereoselektiv ist.

Mehrere Autoren veröffentlichten übereinstimmende Ergebnisse über qualitative und quantitative Unterschiede der beiden optischen Isomere des Oxaprotilin hinsichtlich der Rückaufnahmehemmung von NA und der Entwicklung verringerter adrenerger Ansprechbarkeit (16,47,80).

Untersuchungen der optischen Isomeren von Mianserin bezüglich einer veränderten adrenergen Rezeptoransprechbarkeit nach chronischer Behandlung liegen nicht vor; Versuche mit dem Racemat führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hinsichtlich der Rückaufnahmehemmung konnten auch bei den optischen Isomeren von Mianserin quantitative Unterschiede festgestellt werden (64).

In eigenen Versuchen induzierten sowohl das Oxaprotilin-Racemat als auch beide optischen Oxaprotilin-Isomere nach 9 tägiger Behandlung (30 mg/kg/d oral) eine signifikant verringerte cAMP-Bildung nach Stimulation mit NA, wenn auch quantitativ gesehen das (-)-Isomer beträchtlich geringer aktiv war.

Mianserin zeigte weder als Racemat noch als (+)-Isomer gegeben (30 mg/kg/d) eine Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit. Die Ergebnisse mit dem (-)-Isomer liegen gerade an der Signifikanzgrenze mit $2p < 0.06$ (Tab.4.6.).

(+) (-)

(+)-(S) (-)-(R)

Tab.4.6. Einfluß der AD-Behandlung auf die cAMP-Bildung in Gehirnrindenschnitten der Ratte
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Pharmakon	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrolltiere	13.2 ± 0.6 (14)	32.9 ± 1.4 (14)	
(±)-Oxaprotilin	13.3 ± 0.7 (11)	23.9 ± 1.0 (11)	0.001
(+)-Oxaprotilin	12.8 ± 0.8 (12)	22.4 ± 1.2 (12)	0.001
(-)-Oxaprotilin	12.8 ± 0.5 (11)	26.8 ± 1.7 (11)	0.02
Kontrolltiere	11.4 ± 0.4 (22)	20.6 ± 0.8 (22)	
(±)-Mianserin	12.3 ± 0.4 (17)	21.4 ± 1.1 (17)	n.s.
(+)-Mianserin	11.5 ± 0.3 (17)	21.1 ± 1.2 (17)	n.s.
(-)-Mianserin	10.6 ± 0.3 (17)	18.0 ± 0.8 (17)	0.06

Obwohl die Ergebnisse mit Oxaprotilin und Mianserin unterschiedlich sind, deuten sie in die gleiche Richtung, d.h. es besteht eine Stereospezifität hinsichtlich der Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptoransprechbarkeit.

In beiden Fällen zeigte ein optisches Isomer deutlich erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zum Racemat und dem gegensätzlichen Enatiomer.

4.5. Tierstamm-spezifische Abhängigkeit der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit

Die unterschiedlichen Ergebnisse mit Oxaprotilin zu den publizierten Daten (16,47,80) ließen die Frage nach der Abhängigkeit dieser Ergebnisse von dem behandelten Tierstamm aufkommen. Daher wurden im Folgenden verschiedene Stämme der gleichen Tierspezies (Ratte) mit Oxaprotilin und seinen Isomeren behandelt und die Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptoransprechbarkeit geprüft (Tab.4.7.). Bei beiden Tierstämmen handelt es sich um Sprague-Dawley Ratten, die jedoch nicht mehr als Inzuchtstämme angesehen werden können.

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse von 4.4. in Tab.4.7. noch einmal aufgeführt.

Tab.4.7. Einfluß des Tierstammes auf die Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit nach AD-Behandlung

Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Pharmakon	Tiere von Jautz, Kisslegg	Tiere von Ciba-Geigy Tierfarm, Sisseln
Kontrolltiere	13.2 ± 0.6 (14)	18.0 ± 0.8 (9)
	32.9 ± 1.4 (14)	30.2 ± 1.6 (9)
(±)-Oxaprotilin	13.3 ± 0.7 (11)	18.3 ± 0.4 (7)
	23.9 ± 1.0 (11) *	23.7 ± 1.7 (7) **
(+)-Oxaprotilin	12.8 ± 0.8 (12)	17.6 ± 1.7 (6)
	22.4 ± 1.2 (12) *	24.9 ± 1.9 (6) #
(-)-Oxaprotilin	12.8 ± 0.5 (11)	17.0 ± 1.2 (7)
	26.8 ± 1.7 (11) **	27.0 ± 1.6 (7) ##

Die Daten in der oberen Reihe sind jeweils die Ergebnisse für die basalen, die in der unteren Reihe für die mit 0.1 mM NA stimulierten cAMP-Werte.
* $2p < 0.001$, ** $2p < 0.02$, # $2p < 0.05$, ## n.s.

Mit den Tieren der Ciba-Geigy Tierfarm ließen sich die Ergebnisse von Delini-Stula et al. (16) reproduzieren, wenn auch eine Tendenz für (-)-Oxaprotilin zur Entwicklung adrenerger Subsensitivität sichtbar bleibt. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den beiden Tierstämmen zeigt die Abhängigkeit der o.g. Experimente von den behandelten Versuchstieren und gibt damit einen Hinweis für eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Autoren. In beiden Experimenten zeigte sich das (-)-Isomer von Oxaprotilin quantitativ weniger aktiv als das (+)-Isomer, führte jedoch nur bei den Tieren von Ciba-Geigy zu statistisch signifikanten Unterschieden.

4.6.1. Aktivität der Antidepressiva auf die präsynaptische Rückaufnahme von Noradrenalin - in vitro Versuche

Das erste gemeinsame Merkmal, das für AD festgestellt wurde, war ihre Fähigkeit die Transmitter-Rückaufnahme in das präsynaptische Axon zu hemmen. Es wurden aber auch Substanzen gefunden, die zwar die Rückaufnahme von Neurotransmittern hemmen, jedoch keine antidepressive Wirkung besitzen (11). Andererseits zeigte Sulser et al. mit dem atypischen AD Iprindol eine signifikante Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit, obwohl Iprindol keine Hemmung der NA-Rückaufnahme bewirkt (72,78). Diese Ergebnisse konnten von anderen Autoren nicht voll bestätigt werden (36).

Die folgenden Untersuchungen sollten zu einer Klärung über einen möglichen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Stärke der AD als Rückaufnahmehemmer von NA und der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit führen.

Die Tests wurden wie in 3.12. beschrieben durchgeführt und die aus den Rückaufnahmekurven (Abb.4.5.a - e) erhaltenen Ergebnisse als IC_{50} Werte in Tab.4.8. angegeben.

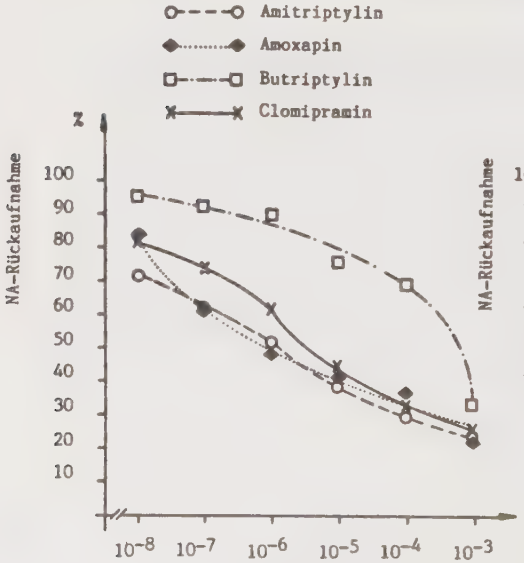


Abb.4.5.a

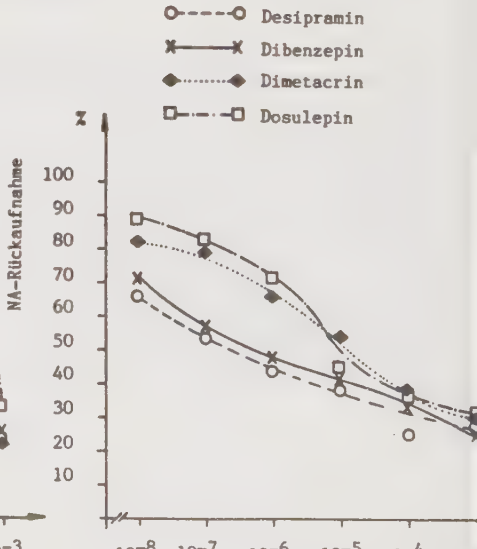


Abb.4.5.b

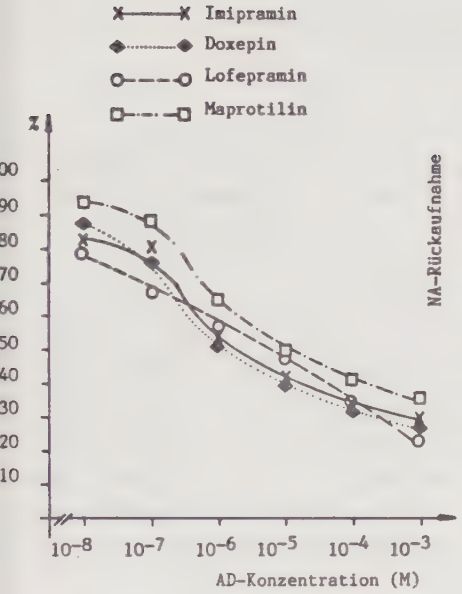


Abb.4.5.c

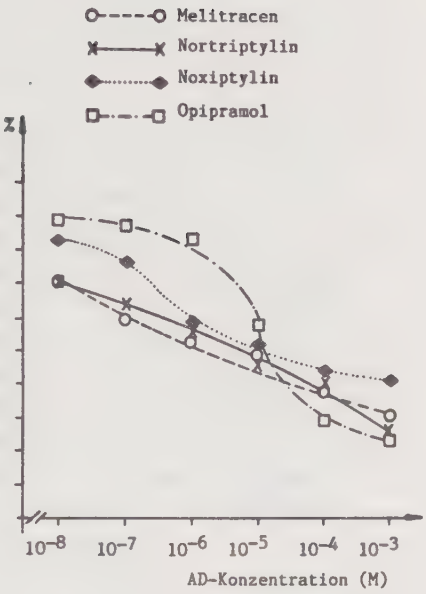


Abb.4.5.d

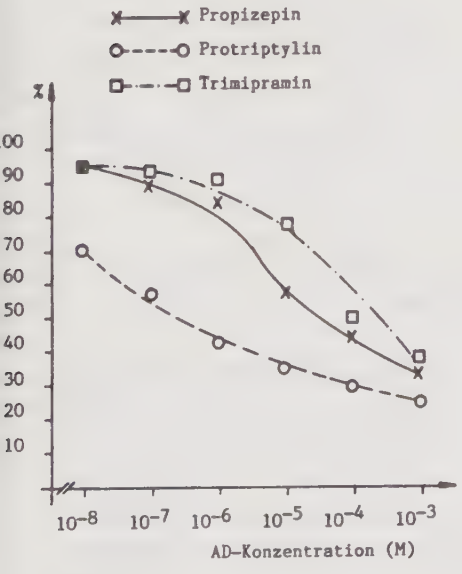


Abb.4.5.e

Abb.4.5. Noradrenalin-Rückaufnahmehemmung durch AD in Gehirnrindenschnitten der Ratte

Der IC_{50} Wert (inhibitory concentration for half maximal effect) ist die Konzentration einer Substanz, bei der im Vergleich zu Kontrollinkubationen die Transmitteraufnahme zu 50% gehemmt wird.

Tab.4.8. Aktivität der AD als Rückaufnahmehemmer von NA bei in vitro Versuchen mit Gehirnrindenschnitten der Ratte

Pharmakon	IC_{50} Wert (µM)	(n)	Pharmakon	IC_{50} Wert (µM)	(n)
Amitriptylin	1.5	(3)	Lofepramin	7.0	(3)
Amoxapin	0.8	(3)	Maprotilin	9.0	(5)
Butriptylin	300.0	(3)	Melitracen	3.5	(3)
Clomipramin	4.0	(3)	Nortriptylin	2.0	(3)
Desipramin	0.2	(3)	Noxiptylin	10.0	(5)
Dibenzepin	0.7	(3)	Opipramol	11.0	(3)
Dimetacrin	11.0	(3)	Propizepin	31.0	(5)
Dosulepin	7.0	(3)	Protriptylin	0.3	(3)
Doxepin	1.0	(3)	Trimipramin	100.0	(7)
Imipramin	1.0	(3)			

In den Versuchen zeigten nur Butriptylin, Propizepin und Trimipramin einen IC_{50} Wert in relativ hohen Konzentration. Alle anderen Substanzen hemmten die NA-Rückaufnahme in geringen Konzentrationen. Die erhaltenen IC_{50} Werte entsprechen publizierten Ergebnissen (48,49,50,79).

Im Vergleich mit den Daten in 4.2.2. und diesem Ergebnis scheint ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Rückaufnahmehemmung von NA und der Entwicklung adrenerger Subsensitivität nicht gegeben zu sein.

4.6.2. Stereospezifität der Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch Oxaprotilin und Mianserin

Ergänzend zu den Untersuchungen in 4.4. über die Stereospezifität für die Entwicklung adrenerger Subsensitivität wurde in der folgenden Versuchsreihe auch die Aktivität der Rückaufnahmehemmung von NA durch die Stereoisomeren geprüft.

Die Experimente wurden wie in 3.12. beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.4.9. und in den Abb.4.6.a und 4.6.b wiedergegeben.

Tab.4.9. Rückaufnahmehemmung von NA bei in vitro Versuchen mit Schnitten der Cortex von Ratten durch Oxaprotilin und Mianserin

Pharmakon	IC_{50} Wert (µM)	(n)	Pharmakon	IC_{50} Wert (µM)	(n)
(±)-Oxaprotilin	0.8	(4)	(±)-Mianserin	11.0	(3)
(+)-Oxaprotilin	0.25	(7)	(+)-Mianserin	11.0	(5)
(-)-Oxaprotilin	80.0	(7)	(-)-Mianserin	400.0	(5)

Bei beiden getesteten AD zeigte das (-)-Isomer weit höhere IC-50 Werte als das (+)-Enantiomer und die racemische Verbindung. Die Ergebnisse bestätigen bereits veröffentlichte Daten (47,64).

Interessanterweise ergeben sich im Vergleich zur Entwicklung adrenerger Subsensitivität für Mianserin gerade umgekehrte Ergebnisse (4.4.), und bestätigen damit das Ergebnis in 4.6.1., daß kein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit und der NA-Rückaufnahmehemmung zu erkennen ist.

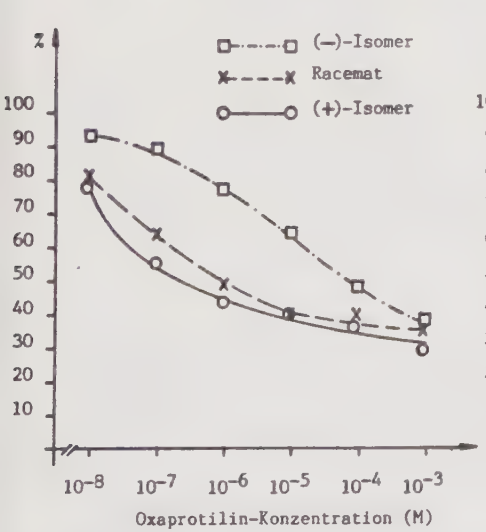


Abb.4.6.a

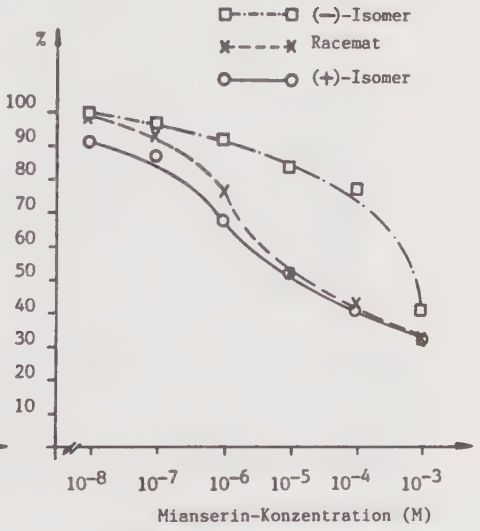


Abb.4.6.b

Noradrenalin-Rückaufnahmehemmung durch AD in Gehirnrindenschnitten der Ratte

4.6.3. Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch Oxaprotilin bei in vivo Versuchen am Rattenherz

Für eine weitere Abklärung über die Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, bei den Untersuchungen über die Entwicklung adrenerger Subsensitivität nach Oxaprotilingabe wurden in vivo Studien über die Rückaufnahmehemmung von NA am Herzen der Ratte durchgeführt.

In diesem Experiment wurden Ratten von Jautz, Kisslegg, wie in 3.5.2. beschrieben vorbehandelt, decapitiert und die ^{3}H-NA Konzentrationsbestimmungen in den Herzen der Versuchstiere in den Laboratorien von Ciba-Geigy, Basel durchgeführt.
Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab.4.10. wiedergegeben, wobei Kontrollwerte als 100% gesetzt wurden.

Tab.4.10. Rückaufnahmehemmung von NA bei in vivo Versuchen am Rattenherz nach Oxaprotilin-Behandlung

Pharmakon	Gruppe I (n)	Gruppe II (n)
(±)-Oxaprotilin	32 ± 2 % (7)	91 ± 14 % (5)
(+)-Oxaprotilin	25 ± 2 % (7)	50 ± 7 % (7)
(-)-Oxaprotilin	42 ± 6 % (6)	99 ± 12 % (6)

Gruppe I: Die Tiere erhielten 2 Std. vor der Decapitation eine einmalige Dosis von 30 mg/kg oral verabreicht.
Gruppe II: Die Tiere wurden 9 Tage mit einer Dosis von 30 mg/kg/d behandelt und ca. 24 Std. nach der letzten Arzneistoffgabe getötet.
100% der Kontrollwerte (n=11) entsprechen 46 pMol ^{3}H-NA/g Herzgewebe (feucht).

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten auf eine rasche Racemisierung der verabreichten optischen Isomere hin (Gruppe I). Im Zusammenhang mit den Daten von 4.5. könnte damit eine unterschiedliche Racemisierung der optischen Isomere in den Versuchstieren als mögliche Ursache für die verschiedenen Ergebnisse in 4.5. angesehen werden.

Die Ergebnisse der Gruppe II zeigen, daß auch 24 Std. nach der letzten Arzneistoffgabe noch eine NA-Rückaufnahme besteht. Im Vergleich zu Gruppe I ist ein deutliches Abklingen der Wirkung jedoch festzustellen und eine direkte Korrelation zur Entwicklung adrenerger Subsensitivität nicht erkennbar, deren Wirkung noch 3 Tage nach dem Ende einer AD-Behandlung feststellbar ist (63,76).

4.7. Einfluß eines Phosphodiesterasehemmers auf die Untersuchungen einer veränderten cAMP-Bildung

In einigen Versuchsreihen (4.3.-4.5.) zeigte sich ein jahreszeitlicher Einfluß (Sommer) auf die Adenylatzyklase-Aktivität im Gehirn der Ratten. Da die nachstehenden Untersuchungen über den Einfluß von T4 und TRH auf die adrenerge Rezeptorempfindlichkeit ebenfalls in Sommermonaten durchgeführt wurden, wurde für die o.g. Experimente der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX zugegeben, um den Abbau des gebildeten cAMP durch dieses Enzym zu verlangsamen.

Um einen eventuellen Einfluß von IBMX auf die durchgeführten Experimente ausschließen zu können, wurden in einem Vorversuch Ratten 9 Tage mit Imipramin behandelt und die Gehirnschnitte der Tiere parallel mit und ohne Zugabe von IBMX inkubiert.
Die Ergebnisse sind in Tab.4.11. wiedergegeben.

Tab.4.11. Einfluß von IBMX auf die Untersuchungen der cAMP-Spiegel (basal und mit 0.1 mM NA stimuliert) in Gehirnrindenschnitten der Ratte
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Behandlung	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	11.8 ± 0.8 (6)	27.8 ± 2.2 (6)	
IMI	11.4 ± 1.0 (5)	18.6 ± 1.0 (5)	0.005
Kontr. + IBMX	17.4 ± 0.8 (7)	59.5 ± 1.7 (7)	
IMI + IBMX	19.1 ± 1.8 (6)	41.3 ± 2.6 (6)	0.001

Die Ergebnisse zeigen, daß der Zusatz von IBMX keinen Einfluß auf die Aussage einer verringerten adrenergen Rezeptoransprechbarkeit nach 9 tägiger IMI-Behandlung hat. Die erhöhten cAMP-Spiegel verändern die erreichten Signifikanzwerte dieses Versuches nicht; die größeren Differenzwerte erleichtern aber die Ergebnisübersicht. Die unerhebliche Differenz der 2p-Werte ist durch die Versuchsungenauigkeiten zu erklären. Gleiche Ergebnisse hat bereits Türck erhalten (76).

4.8. Einfluß von T4 und TRH auf das adrenerge System im Gehirn der Ratte

Klinische Beobachtungen depressiver Patienten bezüglich hormoneller Veränderungen (12,23,29,56), sowie jahrzehntelange Beobachtungen vieler Autoren, daß depressive Symptome bei hypothyroeten Patienten auftreten (81), deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Hormonen, dem adrenergen System und der Genese der Depression hin.

Abweichungen im hormonellen Haushalt müssen im Zusammenhang mit den Transmittersystemen im ZNS gesehen werden. Transmitter greifen über den Hypothalamus und die Hypophyse als übergeordnete Systeme in den hormonellen Haushalt ein; Hormone wiederum beeinflußen über Feed-back Mechanismen den Transmitterumsatz.

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob sich eine Behandlung mit T4, bzw TRH auf das cAMP-bildende System im Gehirn der Ratte auswirkt.

4.8.1. In vitro-Zugabe von T4 und TRH

In den nachstehenden Experimenten wurde in die Reaktionsgefäße, in denen die Gehirnschnitte unbehandelter Tiere inkubiert wurden, T4, bzw. TRH direkt zu gegeben. Die Konzentrationen entsprechen den Werten, die verschiedene Autoren bei Messungen im CSF festgestellt haben (33,38,51). Die Ergebnisse sind in Tab.4.12. angegeben.

Tab.4.12. Einfluß von T4 und TRH auf die cAMP-Bildung bei in vitro-Zugabe
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Zugabe	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	17.2 ± 1.6 (6)	41.9 ± 3.6 (6)	
1.0 nM TRH	19.4 ± 1.9 (3)	40.0 ± 8.0 (6)	n.s.
100.0 nM TRH	17.2 ± 0.4 (3)	40.6 ± 3.5 (3)	n.s.
2.5 µM T4	15.9 ± 0.8 (3)	42.6 ± 4.5 (3)	n.s.

Die erhaltenen Daten zeigen keinen Einfluß von TRH und T4 in vitro auf die basale oder die mit 0.1 mM NA-stimulierte cAMP-Bildung.

4.8.2. Einfluß einer 9 tägigen Behandlung mit T4 und TRH auf das cAMP-bildende System

Ratten wurden wie in 3.5. beschrieben mit T4, bzw. TRH vorbehandelt und der Einfluß auf das cAMP-bildende System der Cortex untersucht. T4 wurde mit einer Dosis von 50 µg/kg s.c. und TRH mit einer Dosis von 0.5 mg/kg oral verabreicht. Zur Versuchskontrolle wurden auch Imipramin-behandelte Tiere parallel getestet.
Die Ergebnisse sind in Tab.4.13. wiedergegeben.

Tab.4.13. Einfluß einer Langzeitbehandlung mit T4, TRH und IMI auf die cAMP-Bildung (basal und mit 0.1 mM NA) Angabe in pmol/mg Protein x 10 Min.

Substanz	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	17.4 ± 0.9 (8)	47.0 ± 2.1 (8)	
Imipramin	18.4 ± 0.6 (3)	36.4 ± 4.3 (3)	0.025
T4	16.3 ± 0.7 (7)	39.3 ± 1.6 (7)	0.020
TRH	16.5 ± 0.8 (7)	45.2 ± 2.4 (7)	n.s.

T4-behandelte Tiere bildeten in diesem Versuch signifikant weniger cAMP nach Stimulation mit NA ohne Einfluß auf die basale cAMP-Bildung. TRH behandelte Tiere zeigten weder auf die basale noch auf die stimulierte cAMP-Bildung eine Wirkung

4.8.3. T4-Konzentrations-Abhängigkeit für die Entwicklung verminderter cAMP-Bildung

Da Konzentrationsangaben für eine Behandlung von Ratten mit T4 für Versuche nicht vorliegen, wurden im folgenden Tiere wie beschrieben mit unterschiedlichen T4-Konzentration, s.c. injiziert, vorbehandelt und eine veränderte Rezeptoransprechbarkeit geprüft, um für weitere Experimente eine angemessene T4-Konzentration verwenden zu können.
Die Ergebnisse sind in Tab.4.14. und Abb.4.7. wiedergegeben.

Tab.4.14. T4-Konzentrationsabhängigkeit für die Entwicklung verminderter cAMP-Bildung in Gehirnrindenschnitten der Ratte

Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

T4-Konz.	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	19.7 ± 0.7 (16)	60.2 ± 2.1 (16)	
0.1 µg/kg	18.2 ± 1.1 (5)	58.2 ± 1.2 (5)	n.s.
0.5 µg/kg	16.4 ± 0.9 (4)	54.4 ± 2.2 (4)	n.s.
1.0 µg/kg	19.1 ± 0.7 (11)	54.0 ± 2.2 (11)	n.s
1.5 µg/kg	19.2 ± 1.3 (5)	52.2 ± 2.8 (5)	n.s.
5.0 µg/kg	19.7 ± 0.7 (15)	48.9 ± 1.7 (15)	0.001
50.0 µg/kg	17.3 ± 0.8 (15)	44.5 ± 2.3 (15)	0.001
100.0 µg/kg	17.9 ± 1.9 (4)	41.8 ± 2.9 (4)	0.02

In dieser Versuchsreihe zeigte T4 bei einer Konzentration von 5 µg/kg eine signifikante Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit, die mit steigender T4-Konzentration zunahm. Die so erhaltene Konzentrations-Aktivitätskurve (Abb.4.7.) zeigt Sättigung bei ca. 50 µg/kg.

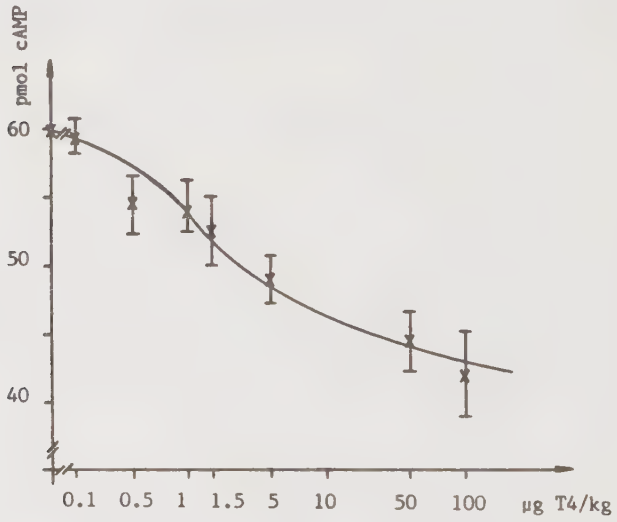


Abb.4.7. Einfluß der täglichen T4-Dosis auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung

4.8.4. Zeitliche Entwicklung signifikant verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit mit T4

Nachdem T4 zwar nach 9 tägiger Behandlung, nicht aber in vitro eine verminderte cAMP-Bildung auslöste, war es für einen weiteren Vergleich zu den AD notwendig die zeitliche Abhängigkeit dieser Entwicklung genauer zu untersuchen.

In dem folgenden Versuch wurden Ratten mit einer täglichen Dosis T4 von 50 µg/kg Körpergewicht, die sich in den o.g. Versuchen (4.8.3.) als optimale Dosis erwies, unterschiedlich lange behandelt und die Entwicklung adrenerger Subsensitivität untersucht. Die erhaltenen Daten sind in Tab.4.15. und Abb.4.8. notiert.

Tab.4.15. Zeitliche Abhängigkeit für die Entwicklung signifikant verminderter cAMP-Bildung mit T4
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Behandlungstage	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	17.1 ± 0.5 (22)	34.3 ± 0.7 (22)	
1 Tag	15.6 ± 0.9 (11)	31.8 ± 1.9 (11)	n.s.
3 Tage	16.3 ± 0.8 (9)	31.4 ± 2.1 (9)	n.s.
5 Tage	15.0 ± 0.7 (10)	30.8 ± 1.4 (10)	0.02
7 Tage	16.3 ± 1.4 (5)	27.7 ± 2.5 (5)	0.001
9 Tage	17.2 ± 1.3 (9)	25.7 ± 1.2 (9)	0.001
9 Tage + 5 Tage	17.1 ± 0.9 (6)	34.9 ± 2.5 (6)	n.s.

Die Versuche wurden jeweils ca. 24 Std. nach der letzten T4-Gabe durchgeführt. 1 Tag Behandlung entspricht somit einer einmaligen T4-Gabe. In der letzten Versuchsreihe wurden die Tiere 9 Tage mit T4 behandelt, der Versuch aber erst 5 Tage nach der letzten T4-Gabe durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen nach 5 tägiger Behandlung mit T4 eine signifikant verringerte NA-stimulierte cAMP-Bildung in der Gehirnrinde, die bis zum 9. Behandlungstag ansteigt. Die letzte Ergebnisreihe läßt erkennen, daß die in 9 Tagen entwickelte, verminderte adrenerge Rezeptorempfindlichkeit bereits 5 Tage nach dieser Behandlung wieder abgeklungen ist. Dies entspricht Ergebnissen, die verschiedene Autoren mit AD erhalten haben (63,76).

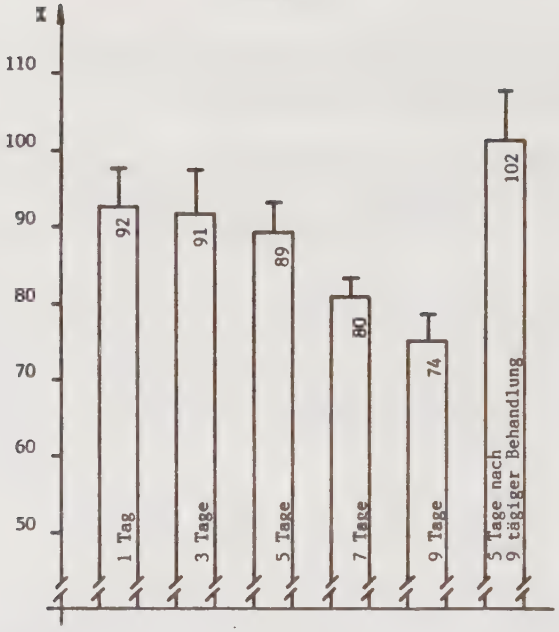


Abb.4.8. Einfluß der Behandlungsdauer mit T4 (50 µg/kg/d) auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung (100% ≙ 34.3 pmol cAMP)

4.8.5. Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin durch T4 und TRH bei in vitro Versuchen an Gehirnrindenschnitten von Ratten

Für die Wirkung der Schilddrüsenhormone auf das adrenerge System im Gehirn wird eine bessere Permeabilität der Bluthirnschranke für Katecholamine vermutet (22). Damit ist eine Erhöhung des Katecholamin-Umsatzes im Gehirn verbunden.

Die folgenden Versuche sollten kontrollieren, ob die festgestellte Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit nach T4-Behandlung mit einer Rückaufnahmehemmung von NA, wie sie bei den meisten AD festgestellt wurde in Zusammenhang steht. Die Experimente wurden wie in 3.12. beschrieben durchgeführt.

Sowohl T4 und TRH zeigten erst in einer Konzentration von 0.1 mM eine Wirkung auf die Rückaufnahme von NA. Eine 50%ige Hemmung konnte aber auch in mM-Konzentrationen nicht festgestellt werden.

4.8.6. Einfluß einer T4-, TRH- und IMI-Behandlung auf die beta-Rezeptoren in der Cortex

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die durch T4 entwickelte, verringerte adrenerge Rezeptorempfindlichkeit wie bei den AD mit einer Verringerung der adrenergen Rezeptoren einhergeht. Parallel zu den T4-behandelten Tieren wurde auch die Cortex der TRH-behandelten Tiere untersucht, um festzustellen, ob eine mögliche Verringerung der beta-Rezeptoren auch nach Behandlung mit Substanzen nachweisbar ist, die keine verminderte cAMP-Bildung hervorrufen. IMI-behandelte Tiere dienten zur positiven Versuchskontrolle.

Die Versuche wurden wie in 3.13. beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.4.16. und den Abb.4.9.a - c und 4.10. angegeben.

Die in den Abb.4.9.a - c aufgetragenen Kurven zeigen alle eine einheitliche Bindungsreaktion mit Sättigungscharakteristik.

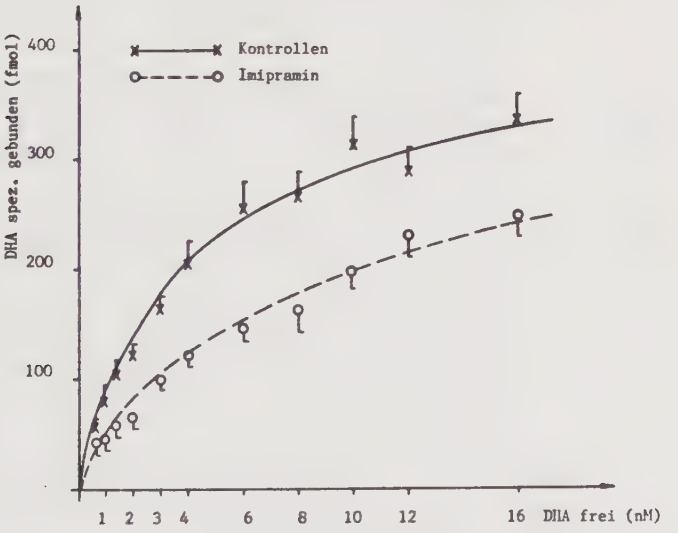


Abb.4.9.a Einfluß einer Imipramin-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex der Ratte

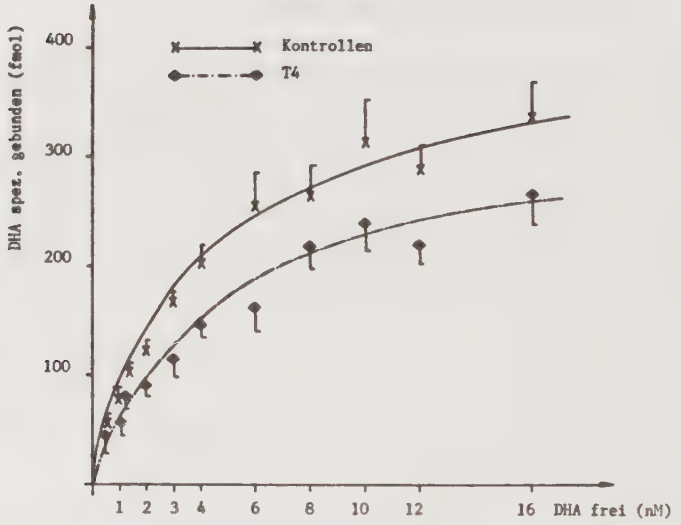


Abb.4.9.b Einfluß einer T4-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex der Ratte

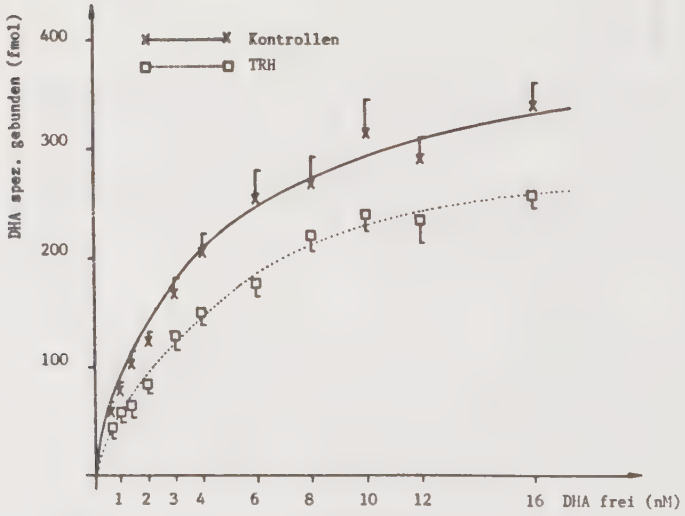


Abb.4.9.c Einfluß einer TRH-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex der Ratte

Tab.4.16. Einfluß einer T4-, TRH- und IMI-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex

Angaben in fmol spez. gebunden/mg Protein x 20 Min.

DHA frei	IMI (3)	p <	TRH (4)	p <	T4 (4)	p <	Kontrollen (4)
0.7 nM	45 ± 4	n.s.	48 ± 9	n.s.	55 ± 9	n.s.	56 ± 8
1.0 nM	44 ± 6	0.01	62 ± 9	n.s.	63 ± 9	n.s.	77 ± 7
1.4 nM	66 ± 3	0.005	68 ± 9	0.025	79 ± 9	0.05	101 ± 7
2.0 nM	65 ± 5	0.005	85 ± 8	0.025	91 ± 12	0.05	121 ± 11
3.0 nM	99 ± 3	0.005	130 ± 8	0.025	118 ± 18	0.025	166 ± 12
4.0 nM	120 ± 8	0.025	150 ± 12	0.05	157 ± 13	0.05	201 ± 22
6.0 nM	144 ± 12	0.025	177 ± 12	0.05	162 ± 21	0.05	255 ± 33
8.0 nM	157 ± 27	0.05	221 ± 14	n.s.	219 ± 19	n.s.	267 ± 31
10.0 nM	196 ± 11	0.05	238 ± 10	0.05	242 ± 35	0.05	312 ± 40
12.0 nM	231 ± 17	0.05	232 ± 22	0.05	276 ± 11	n.s.	285 ± 25
16.0 nM	252 ± 10	0.05	258 ± 11	0.05	255 ± 33	0.05	334 ± 37
$B_{max.}$	269 ± 16	0.001	305 ± 12	0.001	320 ± 15	0.002	422 ± 19
K_D (nM)	4.39 ± 0.3	n.s.	4.12 ± 0.8	n.s.	4.14 ± 0.9	n.s.	4.53 ± 0.9

$B_{max.}$ ist in fmol DHA angegeben, K_D in nM DHA.

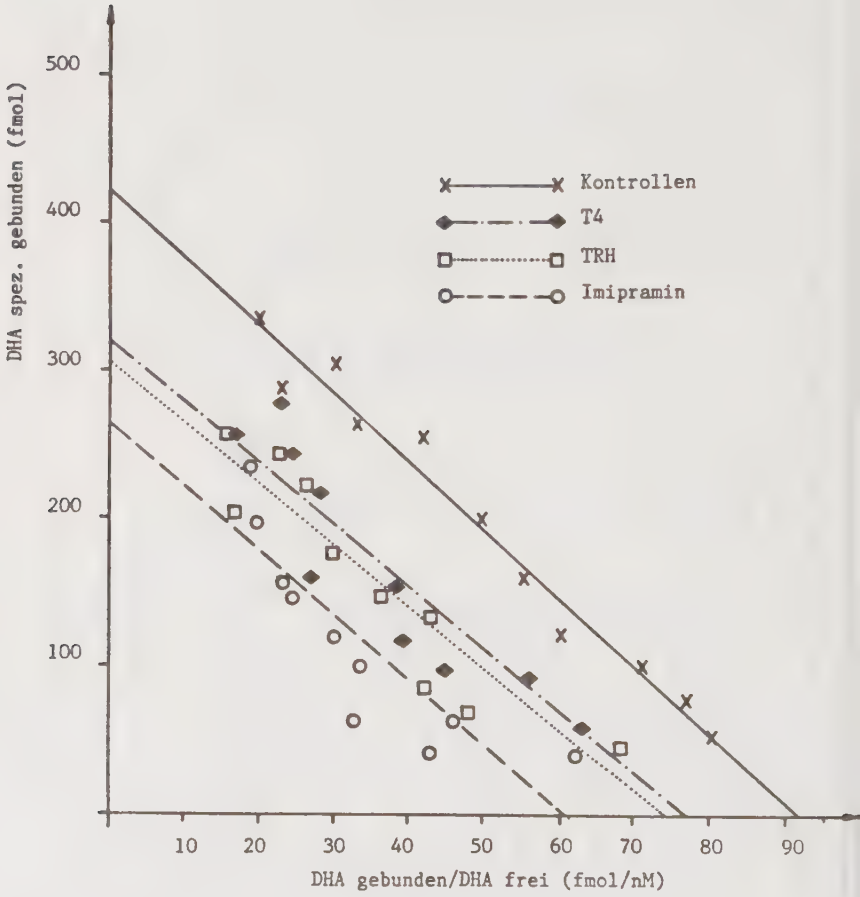


Abb.4.10. Scatchard-Darstellung über den Einfluß einer T4-/ TRH-/ Imipramin-Behandlung auf die DHA-Bindung in der Cortex der Ratte

Im Scatchard-Plot der Abb.4.10. zeigen alle behandelten Tiere einen signifikant geringeren $B_{max.}$-Wert, der für eine verminderte Anzahl beta-Rezeptoren steht, ohne Einfluß auf den Kd-Wert, und damit ohne Änderung in der Affinität dieser Rezeptoren (59,67).

Der Verlauf einer Geraden im Scatchard-Plot steht für eine einheitliche Bindungsstelle; auch ist es damit unwahrscheinlich, daß in den durchgeführten Versuchen unterschiedliche Bindungsreaktionen, wie z.B. eine mögliche kompetetive Hemmung mit physiologischen Liganden auftrat. Für T4 ist mit diesem Ergebnis eine weitere Korrelation in der Wirkung zu den AD bestätigt worden, während mit TRH eine Substanz gefunden wurde, die, ohne die Entwicklung adrenerger Subsensitivität zu induzieren, dennoch zu einer Verringerung der adrenergen beta-Rezeptoren führt.

4.9. Auswirkungen einer kombinierten Behandlung mit Antidepressiva und thyreogenen Hormonen auf die Entwicklung verringerter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit

Die folgenden Versuche sollten den gegenseitigen Einfluß von IMI und T4, bzw. TRH auf die Entwicklung adrenerger Subsensitivität in der Cortex von Ratten klären. Die Tiere wurden wie in 3.5. beschrieben vorbehandelt, dabei erhielt eine Tiergruppe IMI (30 mg/kg) und T4 (50 µg/kg,s.c.), bzw. IMI (30 mg/kg) und TRH (0.5 mg/kg).
Die Ergebnisse sind in Tab.4.17. und den Abb.4.11. und 4.12. wiedergegeben.

Tab.4.17. Einfluß einer IMI/T4, bzw. IMI/TRH kombinierten Behandlung auf die cAMP-Bildung
Angaben in pmol/mg Protein x 10 Min.

Behandlung	cAMP-Basalwert	NA-stimulierter Wert	2p <
Kontrollen	19.2 ± 1.1 (13)	58.4 ± 1.9 (13)	
IMI	19.5 ± 0.9 (12)	38.3 ± 2.1 (12)	0.001
IMI/T4	19.2 ± 1.4 (11)	40.7 ± 1.9 (11)	0.001
T4	20.1 ± 1.4 (11)	48.0 ± 2.1 (11)	0.005
Kontrollen	17.1 ± 0.7 (6)	39.9 ± 1.5 (6)	
IMI	19.4 ± 1.8 (4)	28.7 ± 0.8 (4)	0.001
IMI/TRH	21.0 ± 1.2 (4)	27.6 ± 1.0 (4)	0.001
TRH	17.1 ± 1.7 (4)	35.0 ± 3.1 (4)	n.s.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen weder einen additiven Effekt bei IMI/T4-behandelten Tieren, noch eine Beeinflußung bei den IMI/TRH-behandelten Tieren. Die erhaltenen Daten mit IMI/T4 konnten von Frazer et al. (21) nicht festgestellt werden. Diese Arbeitsgruppe verwendete jedoch geringere Konzentrationen (20 mg/kg IMI und 15 µg/kg T3) und behandelte die Tiere nur 5 Tage.

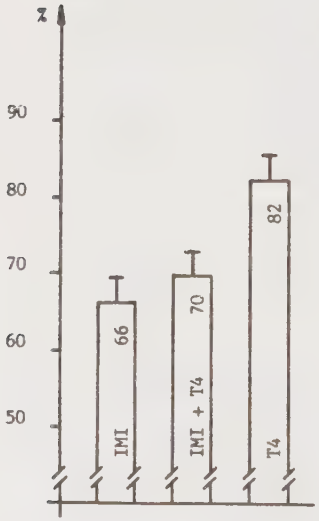


Abb.4.11. Einfluß einer kombinierten IMI/T4-Behandlung auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung (100% ≙ 58.4 pmol cAMP)

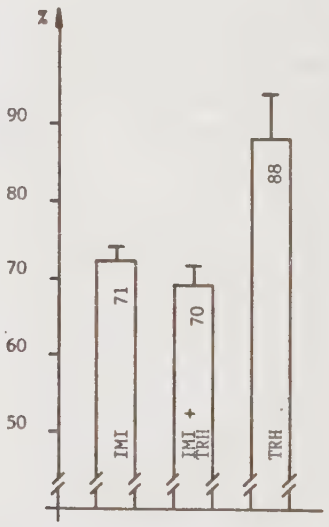


Abb.4.12. Einfluß einer kombinierten IMI/TRH-Behandlung auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung (100% ≙ 39.9 pmol cAMP)

5. Diskussion

Die Diskussion der vorliegenden Ergebnisse ist nach folgenden Gesichtspunkten gestaltet.

1. Verhalten der Tiere während der Vorbehandlung
2. Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit mit verschiedenen AD
3. Zusammenhang zwischen dieser Entwicklung und der NA-Rückaufnahmehemmung durch AD
4. Die Stereospezifität der in 2. und 3. genannten Wirkungen
5. Einfluß des Tierstammes auf die Versuchsergebnisse
6. Die Änderung der adrenergen Rezeptorzahl
7. Der Einfluß einer kombinierten Behandlung mit AD und T4, bzw. TRH

5.1. Verhalten der Tiere während der Vorbehandlung

Erkenntnisse über Zusammenhänge zwischen dem Verhalten von Tieren und der Sensitivität verschiedener Rezeptoren führten zur Entwicklung mehrerer Verhaltensmodelle für Tiere (Streßversuche), die auch Eingang in das Forschungsgebiet der AD fanden. Eine spezielle Versuchsanordnung für depressive Symptome bei Versuchstieren konnte bisher nicht erarbeitet werden.

Mit den Ergebnissen der Beobachtungen in 4.1. läßt sich zusammenfassend feststellen, daß durchschnittlich eine verringerte Gewichtszunahme bei behandelten Tieren besteht und zeitweilig ein ruhigeres Verhalten auftritt. Dies läßt aber keine Korrelation zu biochemischen oder pharmakologischen Wirkungen der getesteten Arzneistoffe erkennen.

Eine Erklärung für das Fehlen bestimmter Verhaltensänderungen der Tiere unter dem Aspekt der biochemischen und pharmakologischen Wirkungen der AD kann in den Betrachtungs- und Testmethoden selbst liegen. Diese sind zum großen Teil zu ungenau und subjektiv, sodaß sich subtile Veränderungen im Verhalten der Tiere leicht den Beobachtungen entziehen können.

5.2. Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit

Grundsätzlich können die geringeren NA-stimulierten cAMP-Spiegel nach einer AD-Behandlung durch eine verminderte Synthese oder einen verstärkten Abbau hervorgerufen werden. Daß letzteres auszuschließen ist, wurde von Türck gezeigt (76). Weder die partikuläre noch die lösliche Phosphodiesterase wurde durch eine 9 tägige Imipramin-Behandlung beeinflußt. Das Gleiche zeigt sich andeutungsweise in dieser Arbeit; keine der getesteten Substanzen beeinflußte die basalen cAMP-Spiegel.

Die verminderte cAMP-Synthese kann durch eine verminderte Adenylatzyklase-Aktivität oder durch Veränderungen der adrenergen Rezeptoren hervorgerufen werden.
Türck konnte anhand zellfreier Adenylatzyklase-Untersuchungen zeigen, daß eine verminderte Adenylatzyklase-Aktivität nach einer AD-Behandlung nicht vorliegt (76). Somit ist eine Ursache für die verminderte cAMP-Bildung nach Stimulation durch NA bei den adrenergen Rezeptoren zu suchen. Viele Autoren konnten inzwischen zeigen, daß die verminderte Aktivität des cAMP-bildenden Systems mit einer Verringerung in der adrenergen Rezeptorendichte korreliert (siehe Übersichtsartikel 11,52,70,73).

Experimente mit Reserpin zeigten nach einer mehrtägigen Behandlung die Entwicklung adrenerger Supersensitivität. Eine gleichzeitige Gabe von Reserpin und Imipramin unterdrückte diese Entwicklung, während eine Imipramin-Behandlung zu adrenerger Subsensitivität führt (63). Beobachtungen depressiver Symptome nach einer Langzeitbehandlung mit Reserpin und die genannten experimentellen Daten ließen auf einen Zusammenhang zwischen der durch AD induzierten Entwicklung adrenerger Subsensitivität und der antidepressiven Wirkung schließen, die Sulser in seiner Hypothese formulierte (71,72).

Für eine Überprüfung auf die Allgemeingültigkeit dieser Hypothese war es nötig eine repräsentative Auswahl von AD zu untersuchen. Eine umfassende und gesicherte Aussage der Ergebnisse sollte eine Struktur-Wirkungs-Analyse bringen. Alle Ergebnisse sind deshalb in Abb.5.1. nochmals zusammengestellt. Dabei wurden die Arzneistoffe unabhängig von ihrer chemischen Struktur ausschließlich nach dem Ausmaß ihrer Wirkung in den Versuchen angeordnet.

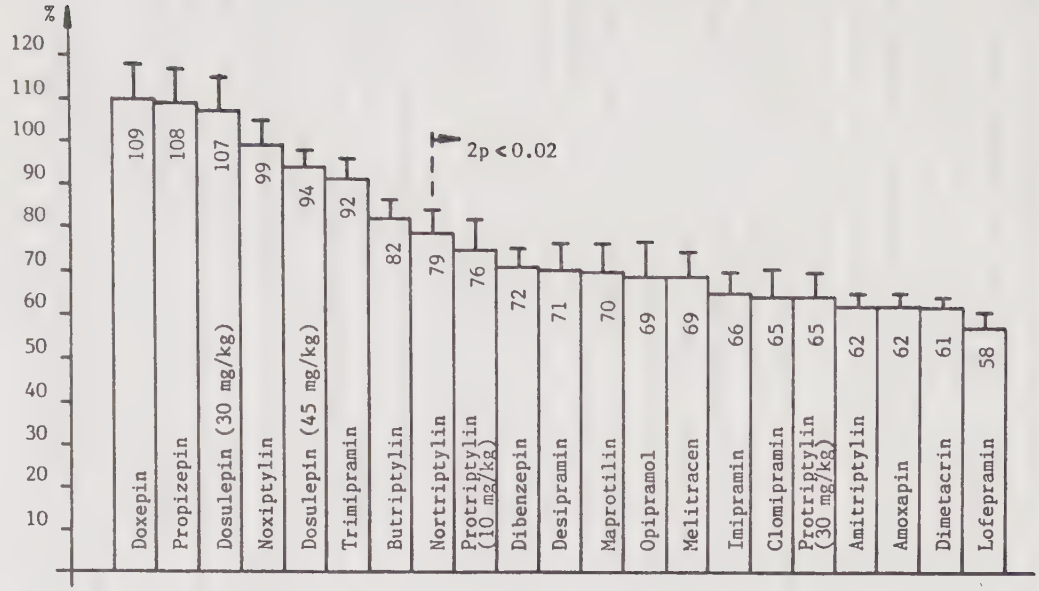


Abb.5.1. Einfluß einer AD-Behandlung auf die NA-stimulierte cAMP-Bildung
(Entsprechende Kontrollwerte wurden als 100% gerechnet)

Variationen der Seitenkette am basischen Stickstoff sind ohne nachteiligen Einfluß auf die Änderung der adrenergen Rezeptorempfindlichkeit. Dies war zu erwarten, da die Metabolisierung dieser Arzneistoffe in erster Linie über eine Demethylierung des basischen Stickstoffs verläuft (5,55). Es wurde gezeigt, daß bereits kurze Zeit nach Gabe der tertiären Amine die sekundären Amine als Hauptmetaboliten im Gehirn nachweisbar sind (7,63). Ohne negativen Einfluß ist auch die Substitution eines Aromaten mit einem Chloratom (Clomipramin). In Verbindung mit der Theorie einer Anlagerung der AD an einen Rezeptor (83), die durch die Entdeckung spezifischer Imipramin-Bindungsstellen im Gehirn (57) Auftrieb erhalten hat, deutet letzteres darauf hin, daß kleinere sterische Behinderungen für die Anlagerung der Aromaten an diesen möglichen Rezeptor von untergeordneter Bedeutung sind.

Interessant sind die Ergebnisse mit Butriptylin, Noxiptylin und Trimipramin (Tab.4.1.,Abb.5.1.). Bei allen drei Substanzen besitzt deren chemische Struktur eine Veränderung zwischen dem Grundgerüst und dem basischen Stickstoff der Seitenkette, und keine dieser Substanzen induzierte die Entwicklung signifikanter adrenerger Subsensitivität. Somit kommt möglicherweise der Struktur der Seitenkette zwischen dem Grundgerüst und dem basischen Stickstoff eine erhebliche Bedeutung für die Aktivität dieser Substanzen, hinsichtlich der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit zu.

Veränderungen im zentralen Siebenring können zum Verlust der Fähigkeit dieser Substanzen führen, die Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit zu induzieren (Dosulepin, Doxepin, Propizepin Tab.4.2., Abb.5.1.). Daß dieser Verlust direkt mit den Veränderungen im zentralen Ring zusammenhängt, erscheint allerdings nicht bewiesen, da Propizepin und Dibenzepin mit der gleichen Grundgerüstdeformation zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Propizepin besitzt wie Butriptylin und Trimipramin eine Iso-Gruppe in der Seitenkette; dies kann einen Bezug zu den Ergebnissen dieser Substanzen darstellen (s.o.). Wahrscheinlicher ist diesbezüglich ein Zusammenhang mit der durch die Ringdeformation bedingten, veränderten Lage der Seitenkette.

Auch eine Verengung des zentralen Siebenringes zum Sechsring zeigt sich ohne Einfluß auf die Entwicklung adrenerger Subsensitivität (Dimetacrin, Maprotilin, Melitracen, Tab.4.3., Abb.5.1.).

Obwohl alle hier getesteten Substanzen als AD in Verwendung sind, führten nicht alle nach 9 tägiger Gabe zur Entwicklung einer adrenergen Subsensitivität. Damit wird die Verallgemeinerung der Hypothese von Sulser, die Entwicklung der verminderten adrenergen Rezeptorempfindlichkeit als antidepressiven Wirkungsmechanismus anzusehen, in Frage gestellt.

Dieses Ergebnis ließ es notwendig werden, die Bedingungen für die Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptoransprechbarkeit detailierter zu überprüfen, insbesondere die zeitliche Korrelation zwischen der biochemischen und der therapeutischen Wirkung, sowie stereochemische Voraussetzungen.

Kein AD zeigte 1 Std. oder 24. Std. nach einer einmaligen Gabe eine Wirkung auf die basale und die NA-stimulierte cAMP-Bildung. Dies deutet somit auf einen adaptiven Mechanismus für die Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit hin. Für diese Annahme sprechen sowohl die Unabhängigkeit der verminderten cAMP-Bildung von der Konzentration des Arzneistoffes am Wirkort (1.Std. Versuch) als auch die notwendige Zeit von mehreren Tagen für diese Entwicklung veränderter adrenerger Sensitivität (24 Std. Versuch).

Die Überprüfung einer Hypothese über den antidepressiven Wirkungsmechanismus kann sich nicht nur auf antidepressiv wirksame Substanzen beschränken, wenn gleiche Eigenschaften auch neuroendokrinologischen Faktoren zugesprochen werden. Die Beobachtung depressiver Symptome hypothyreoter Patienten stellt die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Wirkung thyreogener Hormone und der Depression.

Die in vitro Versuche mit T4 und TRH zeigten keinen Einfluß auf die cAMP-Bildung, während T4 nach 9 tägiger Behandlung signifikant geringere cAMP-Bildung nach Stimulation mit NA induzierte. Weitere Experimente zeigten eine Ähnlichkeit mit den AD auch hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung. TRH induzierte auch nach 9 tägiger Behandlung keine verminderte adrenerge Rezeptorempfindlichkeit. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine geringere Empfindlichkeit der TRH-Rezeptoren nach dessen erhöhter Konzentration durch die Behandlung sein, wie sie bereits für die TSH-Antwort von anderen Autoren diskutiert wurde (35). Außerdem konnten Untersuchungen über die Verteilung von TRH im Gehirn zeigen, daß TRH in der Cortex (dem untersuchten Gehirnteil) nur in geringen Konzentrationen vorliegt (38,51).

Die Parallelität einer Besserung der depressiven Symptome nach einer T3-Behandlung hypothyreoter Patienten und der durch T4 induzierten adrenergen Subsensitivität, sowie die Ergebnisse deren zeitabhängiger Entwicklung sprechen dafür, daß diese Entwicklung im Zusammenhang zur antidepressiven Wirkung stehen kann; von einer allgemeinen Gültigkeit oder einem direkten Zusammenhang kann jedoch nicht ausgegangen werden.

5.3. Rückaufnahmehemmung von Noradrenalin

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung adrenerger Subsensitivität wird heute der erhöhte Transmitterumsatz im synaptischen Spalt angesehen. Ein elektrisches Aktionspotential, begleitet mit einem erhöhten Ca^{2+}-Einstrom führt zur Transmitter-Sekretion, die über einen feed-back Mechanismus präsynaptischer alpha-Rezeptoren reguliert wird (40,42,69). Türck (76) konnte zeigen, daß eine kombinierte 6-Hydroxy-Dopamin/Imipramin-Behandlung nicht zur Entwicklung adrenerger Subsensitivität führt. 6-Hydroxy-Dopamin zerstört selektiv die noradrenergen präsynaptischen Nervenendigungen. Ein Ausbleiben der Imipramin-Wirkung nach der Zerstörung der präsynaptischen noradrenergen Nervenendigungen läßt die Angriffsstelle von Imipramin an diesen präsynaptischen Rezeptoren vermuten.

Alle getesteten AD hemmten die Rückaufnahme von NA mit IC_{50} Werten in physiologischen Bereichen, mit Ausnahme von Butriptylin, Propizepin und Trimipramin (Tab.4.8.). T4 und TRH zeigten selbst in mM Bereich keine Aktivität auf die NA-Rückaufnahme (4.8.5.).
Eine Korrelation zwischen der Rückaufnahmehemmung von NA und der Entwicklung adrenerger Subsensitivität läßt sich mit den erhaltenen Daten nicht aufstellen. Gegen einen direkten Zusammenhang spricht zum einen, daß Substanzen, die keine verminderte cAMP-Bildung induzieren, die Rückaufnahme in z.T. sehr geringen Konzentrationen hemmen (Dosulepin, Doxepin, Tab.4.8.), zum anderen hat T4 keine Aktivität auf die NA-Rückaufnahme und bewirkt dennoch signifikante adrenerge Subsensitivität.

Diese Resultate deuten auf einen flexibleren Zusammenhang zwischen einem erhöhten Transmitter-Umsatz und der Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit, wobei die Rückaufnahmehemmung von Transmittern durch AD nicht zwangsläufig als eine Voraussetzung dafür gesehen werden kann. Z.B. wird ein erhöhter NA-Umsatz im Gehirn nach einer T4-

Behandlung über eine verbesserte Permeabilität der Bluthirnschranke für Katecholamine angenommen (22). Dieses Ergebnis entspricht dem komplexen biologischen Geschehen, das den untersuchten Vorgängen zu Grunde liegt.

In Anlehnung an diese Problematik und die Diskussion einer Rezeptor-Bindungs-Theorie (83,84) sind die Ergebnisse mit Butriptylin, Propizepin und Trimipramin (Tab.4.1. und 4.8.) von besonderem Interesse. Alle drei Substanzen besitzen in der Seitenkette eine Iso-Gruppe und induzierten weder signifikante adrenerge Subsensitivität noch zeigten sie einen IC_{50} Wert in physiologischen Konzentrationen. Ob hier ein ursächlicher Zusammenhang vorliegt (Rezeptorempfindlichkeit und Rückaufnahmehemmung), kann heute noch nicht gesagt werden.

5.4. Stereospezifität

Ergebnisse über spezifische IMI-Bindungsstellen im Gehirn (6,57), die in Verbindung mit der Rückaufnahme von NA (58) und Serotonin (41) stehen sollen, ließen Untersuchungen über die Stereospezifität sowohl der Entwicklung adrenerger Subsensitivität als auch in Bezug auf die Rückaufnahmehemmung von NA durch AD interessant erscheinen.
Die Ergebnisse in 4.4. zeigen eine deutliche stereospezifische Abhängigkeit für die Entwicklung adrenerger Subsensitivität. Mit den optischen Isomeren von Oxaprotilin induzierte das (-)-Enantiomer quantitativ weniger adrenerge Subsensitivität. Noch deutlicher sind die Ergebnisse mit Mianserin; in diesem Fall induzierte nur das (-)-Isomer verminderte cAMP-Bildung.

In 4.6.2. zeigten beide (-)-Isomere einen IC_{50} Wert in unphysiologischen Konzentrationen. Ein Zusammenhang zwischen der Rückaufnahme von NA und der Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit kann daher auch in dieser Versuchsreihe nicht hergestellt werden (siehe 5.3.).

5.5. Einfluß des Tierstammes auf die experimentellen Ergebnisse

Abweichende Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen führten zu der Frage eines möglichen Einflußes der Untersuchungstiere auf die experimentellen Ergebnisse. Unterschiedliche Metabolisierung und Verteilung einer Substanz in verschiedenen Tierspezies sind schon lange bekannt (5,17,55). Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß Imipramin nicht in allen Tierstämmen signifikante adrenerge Subsensitivität induziert (36).

Mit den Ergebnissen in 4.5. wurden gleiche Daten auch für verschiedene Unterstämme eines Tierstammes bestätigt. In der Versuchsreihe 4.6.2. kann die unterschiedliche Racemisierung optischer Isomere in den verschiedenen Tierstämmen als eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse nachgewiesen werden.

5.6. Einfluß auf die adrenergen beta-Rezeptoren

Viele Autoren konnten bereits zeigen, daß die verminderte adrenerge Rezeptorempfindlichkeit nach einer AD-Behandlung mit einer Verringerung der synaptischen beta-Rezeptoren einhergeht (siehe Einleitung).

Die Ergebnisse in 4.8.6. zeigen, daß auch die durch T4 induzierte adrenerge Subsensitivität wie bei den AD mit einer signifikanten Verringerung der beta-Rezeptoren in der Gehirnrinde korreliert. Die Affinität der Rezeptoren gegenüber NA blieb dabei unverändert. Mit diesem Ergebnis kann zusammenfassend gesagt werden, daß die Wirkung von T4 mit einigen Parametern der AD-Wirkung korreliert.

Mit TRH wurde eine Substanz gefunden, die keine verminderte cAMP-Bildung hervorruft, nach 9 tägiger Gabe aber trotzdem zu einer Verringerung der beta-Rezeptoren in der Gehirnrinde führt. Damit erscheinen Ergebnisse anderer Autoren über eine verringerte Anzahl der beta-Rezeptoren nach einer Behandlung mit Dosulepin und Doxepin (2,8,13) nicht mehr im Widerspruch zu eigenen Ergebnissen mit diesen Substanzen über eine fehlende Entwicklung adrenerger Subsensitivität (4.2.) zu stehen.

Die Interpretation dieses Ergebnisses muß unter dem Gesichtspunkt neuer Erkenntnisse über die Verteilung und unterschiedliche Affinität der Rezeptoren im Gehirn, ihre gegenseitige Beeinflußung und Regulation im Wirkungsmechanismus mit einer Adenylatzyklase gesehen werden.

Diese Komplexität des cAMP-bildenden Systems läßt es wenig wahrscheinlich erscheinen, daß Substanzen wie die AD, die in den Transmitterhaushalt des Gehirns eingreifen, nur über das adrenerge System auf die in dieser Arbeit getesteten Parameter wirken. Unter diesen Voraussetzungen erscheinen die erhaltenen Ergebnisse nicht widersprüchlich zu bisherigen Annahmen (s.o.), sie deuten jedoch verstärkt darauf hin, daß sie nur einen Teil der möglichen Reaktionen reflektieren.

Ungeachtet der verschiedenen Wirkungsmöglichkeiten stellt die Tatsache, daß bei einigen AD eine verringerte cAMP-Bildung nach einer längeren Behandlung ausbleibt, ein wesentliche Kriterium gegen eine Verallgemeinerung der Hypothese von Sulser dar.

5.7. Kombinierte Behandlung mit IMI und T4, bzw. TRH

Vielfältige endokrinologische Faktoren spielen sehr wahrscheinlich bei der Auslösung und Genese der Depression eine wichtige Rolle, deren volle Bedeutung heute noch nicht überblickt wird (11,23,29,56). Experimente verschiedener Arbeitsgruppen konnten eine reduzierte Empfindlichkeit von beta-Rezeptoren am Herzen hypothyreoter Ratten feststellen (45,82), die nach Behandlung mit T3 wieder normale Ansprechbarkeit zeigten. Bei hyperthyreoten Ratten wurde dagegen eine erhöhte Empfindlichkeit der beta-Rezeptoren am Herzen gefunden (37). Diese Daten zeigen, daß Schilddrüsenhormone die beta-adrenerge Rezeptorempfindlichkeit beeinflußen können, wenn auch die Effekte in verschiedenen Organen nicht gleichsinnig sein müssen (74, siehe 5.6.).

Mit den Versuchen in 4.9. wurde gezeigt, daß eine kombinierte Behandlung mit T4/IMI, bzw. TRH/IMI weder einen additiven noch einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung der adrenergen Subsensitivität besitzt. Bei diesem Ergebnis ist jedoch zu berücksichtigen, daß die erwähnte Plastizität des ZNS durch die relativ hohe Dosis von 30 mg/kg Imipramin bereits erschöpft sein kann. Weitere Aussagen über mögliche gegenseitige Effekte könnten zukünftige Versuche mit geringeren IMI-Dosen bringen.

Eine allgemeinere Klärung der Zusammenhänge zwischen der Depression und dem hormonellen Haushalt (z.B. ACTH, GH, Östrogen, Prolactin, TRH, T4) und der Sensitivität der adrenergen Rezeptoren kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht gegeben werden. Vieles deutet aber auf unterschiedliche regulative Mechanismen bei der Depression. Für diese Annahme sprechen auch die recht unterschiedlichen Bilder einer depressiven Erkrankung (3,28,32).

5.8. Die Rolle des adrenergen Systems

Die diskutierten Daten zeigen einen Teilaspekt der gesamten weitreichenden Bedeutung des adrenergen Systems in der Behandlung depressiver Symptome. Dabei sollte dieses im Zusammenhang mit anderen Transmittersystemen gesehen werden.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluß zu, daß eine einheitliche Korrelation zwischen den Wirkungen auf das adrenerge System und einem antidepressiven Wirkungsmechanismus nicht besteht. Dies läßt sich möglicherweise durch die o.g. Zusammenhänge der verschiedenen Transmittersysteme erklären, deutet aber gleichzeitig auch darauf hin, daß das adrenerge System nicht als einziger zentraler Ausgangspunkt für depressive Symptome angesehen werden kann. Damit muß auch die Frage nach einer Verallgemeinerung der Hypothese von Sulser eindeutig verneint werden.

Dieses Ergebnis gibt leider keine weiteren Hinweise auf eine Lösung des Problems. Zusammengefaßt deuten die einzelnen Teilergebnisse, unter besonderer Berücksichtigung der endokrinologischen Daten vielleicht auf ein übergeordnetes System, das die adrenergen Schaltkreise (und evtl. weitere Transmittersysteme) mit unterschiedlichen regulativen Mechanismen steuert (peptiderge Transmitter?). Die Annahme eines solchen übergeordneten Systems ist in der Lage, scheinbare Widersprüche nicht nur innerhalb der verschiedenen AD, sondern auch in der Wirkungsweise einzelner AD und endokrinologischer Faktoren zu erklären.

6. Zusammenfassung

Ratten wurden 9 Tage mit verschiedenen trizyklischen AD unterschiedlicher chemischer Struktur, bzw. mit T4 oder TRH behandelt, um die Auswirkungen dieser Behandlung auf das adrenerge System in der Gehirnrinde der Versuchstiere zu untersuchen.
An Hand einer repräsentativen Struktur-Wirkungs-Untersuchung sollte eine Aussage über eine gültige Verallgemeinerung der Hypothese von Sulser erhalten werden, die einen direkten Zusammenhang zwischen der Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit und dem antidepressiven Wirkungsmechanismus herstellt.

Nicht alle getesteten AD induzierten signifikante adrenerge Subsensitivität. Im Vergleich mit der Struktur der AD kann gezeigt werden, daß die Lage der Seitenkette im Molekül von besonderer Bedeutung für die o.g. Entwicklung ist.
Variationen im Grundgerüst spielen diesbezüglich nur eine untergeordnete Rolle, die im Zusammenhang mit der veränderten Lage der Seitenkette, hervorgerufen durch die Grundgerüst-Veränderungen, gewertet werden muß.

Untersuchungen über die Aktivität der Rückaufnahmehemmung von NA der AD lassen keinen direkten Zusammenhang mit der Entwicklung veränderter adrenerger Rezeptoransprechbarkeit erkennen. Auch AD die keine adrenerge Subsensitivität hervorrufen hemmen die NA-Rückaufnahme bereits in geringen Konzentrationen. Stereospezifische Experimente mit Oxaprotilin und Mianserin, sowie ein Vergleich der genannten Aktivitäten der AD mit T4, bzw. TRH bestätigen dieses Ergebnis.

Die Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit durch T4 korreliert in den getesteten Parametern im Vergleich mit den AD; mit Ausnahme der NA-Rückaufnahmehemmung.

Ergebnisse über eine verringerte Anzahl adrenerger beta-Rezeptoren nach einer T4-, bzw. TRH-Behandlung in der Cortex der Versuchstiere lassen vermuten, daß die Verringerung dieser adrenergen beta-Rezeptoren nicht unbedingt als Voraussetzung für die Entwicklung verminderter cAMP-Bildung angesehen werden kann. TRH-behandelte Tiere, bei denen keine adrenerge Subsensitivität festzustellen ist, zeigen ebenfalls einen signifikant geringeren $B_{max.}$-Wert für die DHA-Bindung in der Cortex.

Die Kombination eines AD mit T4, bzw. TRH bleibt in den durchgeführten Versuchen ohne additiven oder negativen Effekt auf die Entwicklung verminderter adrenerger Rezeptorempfindlichkeit.

Mit den erhaltenen Daten dieser Arbeit muß eine Verallgemeinerung der Hypothese von Sulser verneint werden. Das adrenerge System stellt nur einen Teilaspekt in der Komplexität einer Depression dar, und kann nicht als einziger zentraler Ausgangspunkt für depressive Symptome angesehen werden.
Im Zusammenhang mit endokrinologischen Daten hinsichtlich der Depression läßt sich möglicherweise ein übergeordnetes System vermuten, das bisherige Widersprüche nicht nur zwischen den AD und endokrinologischen Faktoren klären könnte.

7. Literatur

1) Axelrod, J., Whitby, L.G., Hertting, G.: Science, 133, 383 (1961)

2) Banerjee, S.P., Kung, L.S.: Nature 268, 455 (1977)

3) Bech, P., Gram, L.F., Reisby, N., Rafaelsen, O.J.:
Acta Psychiatr. Scand. 62, 140 (1980)

4) Bergstrom, D.A., Kellar, K.J.: Nature 278, 464 (1979)

5) Beyer, K.-H.: Biotransformationen
Wiss.Verlagsges. mbH, Stuttgart (1975)

6) Biegon, A., Samuel, D.: Biochem. Pharm. 28, 3361 (1979)

7) Bickel, M.H., Weder, H.J.: Arch. Int. Pharmacodyn. 173, 433 (1968)

8) Buckett, W.R., Diggory, G.L., Thomas, P.C.:
Naunyn-Schmiedebergs's Arch. Pharmacol. 300, 31 (1977)

9) Buckett, W.R., Diggory, G.L., Thomas, P.C.: 13th C.I.N.P.
Congress, Jerusalem, 370 abs. (1982)

10) Bylund, J.B., Snyder, S.H.: Mol. Pharmacol. 12, 568 (1976)

11) Charney, D.S., Menkes, D.B., Heninger, G.R.:
Arch. Gen. Psychiatry 38, 1160 (1981)

12) Chen, C.: Brit. J. Psychiat. 135, 385 (1979)

13) Clements-Jewery, S.: Neuropharm. 17, 779 (1978)

14) Daly, J.W.: Life Sciences 18, 1349 (1976)

15) Daniel, W., Adamus, A., Melzacka, M., Szymura, J., Vetulani, J.:
Naunyn-Schmiedebergs's Arch. Pharmacol. 317, 209 (1981)

16) Delini-Stula, A., Hauser, K., Baumann, P., Olpe, H.-R.,
Waldmaier, P.C., Storni, A.:
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 23, 265 (1982)

17) Dingell, J.V., Sulser, F., Gilette, J.R.:
J. Pharmacol. Ext. Ther. 143, 14 (1964)

18) Domenjoz, R., Theobald, W.: Arch. Int. Pharmacodyn. 120, 450 (1959)

19) Duhm, B., Maul, W., Medenwald, H., Patzschke, K., Wegner, L.:
Drug Research 19, 858 (1969)

20) Faigle, J.W., Dieterle, W.: J. Int. Med. Res. 1, 281 (1973)

21) Frazer, A., Pandey, G., Mendels, J., Neely, S., Kane, M., Hess, M.E.:
Neuropharmacology 13, 1131 (1974)

22) Ganong, W.F.: Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1979)

23) Garver, D.L., Davies, J.M.: Life Sciences 24, 383 (1979)

24) Gilman, A.G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 305 (1970)

25) Glotzbach, R.K., Preskorn, S.H.: Psychopharmacology 78, 25 (1982)

26) Grahame-Smith, D.G., Green, A.R., Costain, D.W.:
The Lancet, 254 (1978)

27) Greengard, P., McAfee, D.A., Kebebian, J.W.:
Adv. Cyc. Nucl. Res. 1, 337 (1972)

28) Hamilton, M.: J. Clin. Psychiatr. 41, 21 (1980)

29) Hatotani, N., Nomura, J., Inoue, K., Kitayama, I.:
Psychoneuroendocrinology 4, 155 (1978)

30) Hermann, B.: Drug Research 14, 219 (1964)

31) Hobbs, D.C.: Biochem. Pharmacol. 18, 1941 (1969)

32) Hollister, L.E., Kenneth, L.D., Philips, A.B.:
Arch. Gen. Psychiatry 37, 1107 (1980)

33) Kirkegaard, C., Bjorum, N., Cohn, D., Faber, J., Lauridsen, U.B.,
Nerup, J.: Psychoneuroendocrinology 2, 131 (1977)

34) Kirkegaard, C., Smith, E.: Psychological Med. 8, 501 (1978)

35) Kirkegaard, C., Faber, J., Hummer, L., Rogowski, P.:
Psychoneuroendocrinology 4, 227 (1979)

36) Kopanski, C., Türck, M., Schultz, J.E.:
Neurochem. Int., in Druck (1983)

37) Krawietz, W., Werdan, K., Erdmann, E.:
Biochem. Pharmacol. 31, 2463 (1982)

38) Kubek, M.J., Lorincz, M.A., Wilber, J.F.:
Brain Research 126, 196 (1977)

39) Kuhn, R.: Schweiz. med. Wschr. 87, 1135 (1957)

40) Langer, S.Z.: Br. J. Pharmac. 60, 481 (1977)

41) Langer, S.Z., Moret, C., Raisman, R., Dubocovich, M.L., Briley, M.:
Science 210, 1133 (1980)

42) Llinas, R.R.: Spektrum der Wissenschaft 12, 34 (1982)

43) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

44) Luban-Plozza, B., Pöldinger, W.:
Med.Kurse ärztl. Fortbild. 25, 515 (1975)

45) Marwaha, J., Prasad, K.N.: Science 214, 675 (1981)

46) Michaelis, W.: Drug Research 17, 181 (1967)

47) Mishra, R., Gillespie, D.D., Lovell, R.A., Robson, R.D., Sulser, F.:
Life Sciences 30, 1747 (1982)

48) Mundo, A.S., Bonaccorsi, A., Bareggi, S.R., Franco, R.,
Morselli, P.L., Riva, E., Garattini, S.:
Eur. J. Pharmacol. 28, 368 (1974)

49) Nielsen, I.M.: Handbook of Exper. Pharmacol. 55/I, 400 (1980)

50) Okada, T., Seki, Y., Kuruma, I.: Psychopharmacology 63, 67 (1979)

51) Oliver, C., Eskay, R.L., Ben-Jonathan, N., Porter, J.C.:
Endocrinology 95, 540 (1974)

52) Olpe, H.-R.: J. Drug Research, in Druck (1983)

53) Oswald, I., Brezinova, V., Dunleavy, L.F.:
Brit. J. Psychiat. 120, 673 (1972)

54) Pandey, G.N., Heinze, W.J., Brown, B.D., Davis, J.M.:
Nature 280, 234 (1979)

55) Pfeiffer, S.: Biotransformationen; Verlag Chemie, Weinheim (1980)

56) Prange, A.J., Lipton, M.A., Nemeroff, C.B., Wilson, I.C.:
Life Sciences 20, 1305 (1977)

57) Raisman, R., Briley, M., Langer, S.Z.: Nature 281, 148 (1979)

58) Rehavi, M., Skolnick, P., Hulihan, B., Paul, S.M.:
Eur. J. Pharmacol. 70, 597 (1981)

59) Scatchard, G.: Ann. N.Y. Aca. Science 51, 660 (1949)

60) Schildkraut, J.J.: Am. J. Psychiat. 122, 509 (1965)

61) Schildkraut, J.J., Gordon, E.K., Durell, J.:
J. psychiat. Res. 3, 213 (1965)

62) Schloßmann, K., Kroneberg, G.: Drug Research 19, 871 (1969)

63) Schocker, W.F.: Inaugural-Diss., Univ. Tübingen (1979)

64) Schoemaker, H., Berendsen, H.H.G., Stevens, H.J.T.,
Nickolson, V.J.: Psychopharmacol. 74, 137 (1981)

65) Schultz, J.: Nature 261, 417 (1976)

66) Schultz, J.E., Siggins, G.R., Schocker, W.F., Türck, M., Bloom, F.E.: J. Pharmacol. Exper. Ther. 216, 28 (1980)

67) Segal, I.H.: Enzym Kinetics; John Wilej & Sons, New York, Toronto (1975)

68) Skolnick, P., Daly, F.W.: Science 184, 175 (1974)

69) Starke, K., Taube, H.D., Borowski, E.: Biochem. Pharmacol. 26, 259 (1977)

70) Sugrue, M.F.: Pharmac. Ther. 13, 219 (1981)

71) Sulser, F., Vetulani, J., Mobley, P.L.: Biochem. Pharmacology 27, 257 (1978)

72) Sulser, F.: Pharmakopsychiat. 11, 43 (1978)

73) Sulser, F.: Adv. in Psychopharmacol. 32, 1 (1982)

74) Taylor, S.E.: Br. J. Pharmac. 78, 639 (1983)

75) Thiele, J., Holzinger, O.: J. Liebigs Ann. Chem. 305, 96 (1899)

76) Türck, M.: Inaugural-Diss., Univ. Tübingen (1981)

77) Vetulani, J., Sulser, F.: Nature 257, 495 (1975)

78) Vetulani, J., Stawartz, R.J., Dingell, J.V., Sulser, F.: Naunyn-Schmiedebergs's Arch. Pharmacol. 293, 109 (1976)

79) Waldmeier, P.C., Baumann, P., Greengrass, P.M., Maitre, L.: Postgrad. Med. J. 52, 33 (1976)

80) Waldmeier, P.C., Baumann, P.A., Hauser, K., Maitre, L., Storni, A.: Biochem. Pharmacol. 31, 2169 (1982)

81) Whybrow, P.C., Prange, A.J., Treadway, J.R.: Arch. Gen. Psychiatr. 20, 48 (1969)

82) Whybrow, P.C., Prange, A.J.: Arch. Gen. Psychiatr. 38, 106 (1981)

83) Wilhelm, M., Kuhn, R.: Pharmakopsychiatrie 6, 317 (1970)

84) Wilhelm, M.: Depressionen, Ciba-Geigy; Division Pharm., 129 (1972)

Lebenslauf

23.5.1956	geboren in Löwen
1963-1966	Fuchshofschule in Schorndorf (Grundschule)
1966-1972	Gottlieb-Daimler-Realschule in Schorndorf
8.7.1972	Mittlere Reifeprüfung
1972-1975	Technisches Gymnasium der Max-Eyth-Schule in Stuttgart
10.6.1975	Reifeprüfung
1975/76	15 Monate Wehrdienst
ab WS 1976/77	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
7.9.1978	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
19.3.1980	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1.4.1980 - 31.3.1981	Pharmaziepraktikum bei Herrn Apotheker Heiko Klein, Bären-Apotheke in Grunbach
9.4.1981	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
29.4.1981	Approbation zum Apotheker
1.5.1981	Beginn der vorliegenden Arbeit
31.9.1983	Abschluß dieser Arbeit

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Chemie:	M. Hanack
	E. Lindner
Hygiene, Mikrobiologie:	K. Botzenhardt
Pharmakologie:	H.P.T. Ammon
Pharm. Biologie:	E. Reinhard
Pharm. Chemie:	H. Auterhoff
	K.-A. Kovar
	J. E. Schultz
Pharm. Technologie:	E. Graf
	H. Hamacher
Physik:	H. Seiler

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353